

明細書

幹細胞を未分化状態のまま維持するタンパク質

5

技術分野

本発明は、幹細胞の生あるいは死を制御する因子に関する。さらに詳しくは、造血幹細胞の死への過程を抑制し、生への過程を促進する機構を制御するタンパク質に関する。

10

背景技術

再生医学（再生医療）による疾患治療が最近注目を浴びている。しかし、これを臓器ないし組織機能不全を呈する多くの患者に対して日常的に適応するまでには至っていない。今まで、そのような患者の治療として、臓器移植のほか、医療機器での補助システムの利用がごく限られた患者に適応されているにすぎない。しかし、これらの治療法には、ドナー不足、拒絶、感染、耐用年数などの問題がある。特に、ドナー不足は深刻な問題であり、骨髄移植の場合、国内外で骨髄ないし臍帯血バンクが次第に充実してきたといつても、限られたサンプルを多くの患者に提供することが困難である。従って、これらの問題を克服するために幹細胞治療とその応用を中心とした再生医学に対する期待がますます高まっている。

本明細書において「再生」とは、損傷した組織ないし臓器が元通りに回復することをいい、病理的再生ともいう。生物の体は一生の間に外傷や病気によって臓器の一部を失ったり、大きな傷害を受けたりする。その場合、損傷した臓器が再

生できるか否かは、臓器によって（または動物種によって）異なる。自然には再生できない臓器（または組織）を再生させ、機能を回復させようというのが再生医学である。組織が再生したかどうかは、その機能が改善したかにどうかによって判定することができる。哺乳動物は、組織・器官（臓器）を再生する力がある程度備えている（例えば、皮膚、肝臓および血液の再生）。しかし、心臓、肺、脳などの臓器は再生能力に乏しく、一旦損傷すると、その機能を再生させることができないと考えられてきた。従って、従来であれば、例えば、臓器が損傷した場合、臓器移植による処置しかほとんど有効な措置がなかった。

再生能力の高い臓器には幹細胞が存在することが古くから想定されていた。この概念が正しいことは動物モデルを用いた実験的骨髄移植によって証明された。そして、その後の研究によって骨髄中の幹細胞がすべての血液細胞再生の源であることが明らかにされた。幹細胞は骨髄、皮膚等の再生能力の高い臓器に存在することも明らかにされた。さらに、再生されないと長年思われてきた脳にも、幹細胞が存在することが明らかとなってきた。すなわち、体内的あらゆる臓器には幹細胞が存在し、多かれ少なかれ、各臓器の再生を司っていることがわかつてきた。また、各組織に存在する幹細胞には予想以上に可塑性があり、ある臓器中の幹細胞は他の臓器の再生にも利用できる可能性が指摘されている。

幹細胞は今まで不可能であった臓器の再生にも利用できる可能性がある。幹細胞治療を中心として、再生医学はその注目度を増している。近年、医学・医療分野から再生に関する研究の必要性が高まるにつれて、幹細胞または器官形成に関する知見が毎年、増大している。例えば、全能性を有する胚性幹細胞（ES細胞）の樹立と成体細胞からのクローン個体の作製が特に注目されている。幹細胞治療に発生・再生に関する技術を利用できるからで、幹細胞を用いた再生医学は各分野で臨床応用を目的とした、準備段階にはいっている。また、すでに実用

化がすすんでいる分野もある。

再生医学の源として再構築生物学の存在がある。再構築生物学は、1907年にWilsonが海綿をピペットで処理して細胞を分解し、再度混合すると海綿個体になることを示したことに端を発する (Wilson, H. V. J. Ex p. Zool. 5: 245-248. 1907)。高等生物での組織再構築は、1955年のTownesおよびHolttfreterによる両生類の胚再構築が注目される。ここでは、両生類の胚を希アルカリ溶液で処理した解離細胞を混合すると再構築されることが見い出された。その後も種々の再構築が試みられたが、成体組織の再構築について、目立った進展は1980年代になるまではなかった。

再生医学が一般に認識し始められたのは火傷の治療への応用であった。1981年にBeilは人工皮膚をはじめて作製し火傷の治療へと応用した (Beil, E. et al. Science, 211: 1052-54, 1981)。ここでは、皮膚の線維芽細胞をコラーゲンゲル中に埋め込み、その表面に表皮細胞を培養し、人工皮膚を作製した。ここでは、細胞と細胞外マトリクスとを材料として三次元的に器官を再構築する発想が注目された。

再生医学においては、器官・臓器の再構築が最重要となる。この場合、大きく分けて生体外で器官を構築し人工器官として用いる方法と、生体内で器官を再構築させる方法とがある。いずれの場合でも、器官の構築には幹細胞が必要となる。ここで用いられる幹細胞にとって重要な性質としては、多能性および自己複製能がある。

25

幹細胞には大きく分けて、胚性幹細胞と体性幹細胞とが存在する。体性幹細胞

の中でも古くから注目されていたものとして、造血幹細胞がある。寿命の短い成熟血球をヒトの一生の間維持するためには、造血幹細胞の自己複製能と多分化能とが必要であり、このことは、1961年にすでに提唱されていた (Till, J. E., et al., Radiat. Res. 14: 213-222)。1
5 1972年にマウスモデルを用いた骨髄移植法が確立され (Micklem, H. S. et al. : J. Cell Physiol., 79: 293-298, 1972)、造血系再構築を調べることにより造血幹細胞を検出することができるようになって以来、造血幹細胞の研究は飛躍的に進展した。その後の研究により、自己複製能と多分化能との両方を有する造血幹細胞の存在が示された (Dick, J. E., et al. ; Cell 42; 71-79, 1985)。しかし、造血幹細胞は、マウスの場合でも10万個の骨髄細胞中に数個程度という低い頻度で存在することから、実際の研究または臨床応用する場合には、濃縮・純化する必要がある。

15 従来から造血幹細胞移植治療は行われていたが、天然の細胞を濃縮したものを使用していたことから、種々の副作用があった。例えば、大量抗癌剤または放射線照射を用いた移植前処置による副作用 (RRT) が存在していた。また、前処置による骨髄抑制中の細菌・真菌感染症、出血；他人からの移植の場合、ドナーの白血球が生着して増えてきた時に患者臓器を異物（他人）とみなして攻撃する
20 反応（移植片対宿主病=GVHD）；サイトメガロウィルス (CMV) 肺炎を中心とする様々な肺合併症；血管内皮細胞（血管の内側を覆っている細胞）の障害による種々の内臓障害；生着後にも遷延する免疫抑制状態（少なくとも1～2年）の間に罹患する様々な感染症；遷延し様々な症状を呈する慢性GVHD；二次性発癌、性腺機能障害、不妊などの晚期障害などの副作用があった。

25

以上のような合併症のために、移植を行ったがために、かえって一時的に全身

状態が悪くなるということはしばしば起こる。また、合併症のために死亡する患者も、自家移植でも10～20%、他人からの移植では20～40%程度認められる。また、これらの合併症を乗り越えても、もとの病気が再発する可能性があり、現在の移植治療の限界があった。

5

骨髄移植後の合併症による早期死亡を予防することを目的に幹細胞を分離・純化し、生体外で幹細胞から前駆細胞を大量に産生し、それを幹細胞とともに移植することによって行う治療法が登場した。国外ではすでに臨床試験が試みられようとしている。

10

一方、幹細胞に遺伝子を導入し、その幹細胞を移植することによって遺伝子治療を行う試みがはじまった。例えば、X連鎖性重症複合免疫不全症の患者にIL-2受容体 γ 鎖を導入した幹細胞（CD34陽性骨髄細胞）を移植することによって臨床症状が改善することが報告されている（Cavazzana-Calvo, M. et al. Science, 288: 669-672）。幹細胞に遺伝子導入する際には、幹細胞を短期間培養する必要があり、その期間、いかに幹細胞を分化させないで生存させることができるかが遺伝子治療成功の鍵である。

20 FACS (fluorescence activated cell sorter) が1980年代に提唱されて以来、FACSを使用した方法が造血幹細胞の濃縮・純化に多用されている。多重染色した骨髄細胞からCD34-KSL細胞を分離することによって純度の高い造血幹細胞が得られることが明らかになっている（Osawa, M. et al. Science, 273: 242-245, 1996）。上述のように、多分化能および自己複製能は幹細胞の本質である。その能力を十二分に引き出すためには幹細胞を濃縮・純化し、そ

れを体外培養によって増幅することが重要となる。

幹細胞の分化を調節する機構として種々のタンパク質が重要な役割を果たす。

例えば、幹細胞因子 (stem cell factor または steel factor ; SCFともいう) は、造血幹細胞では注目されている因子である。

SCFは、骨髓ストローマ細胞により生成され、多能性幹細胞、CFU-GM のCFU-M、CFU-Megなどの骨髓系細胞、リンパ系幹細胞に作用し、これらの分化を支持する。すなわち造血幹細胞から分化細胞へのほぼすべての系統の分化段階の細胞に作用して、他のサイトカインによる最終分化段階への分化誘導する作用を助けるとされる (北村聖 (S. Kitamura) 、サイトカインの最前線、羊土社、平野俊夫 (T. Hirano) 編、174頁～187頁、2000)。

しかし、SCF単独の作用は弱く、他の因子と協働でなければ充分に機能しないようである。例えば、SCFは、インターロイキン (IL) - 3、IL - 6、IL - 11、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) などの他のサイトカインの存在下で、造血幹細胞の分化・増殖を強く誘導する。また、肥満細胞、赤芽球系前駆細胞、顆粒球マクロファージ系前駆細胞、巨核球系前駆細胞などの分化・増殖も誘導する。

従って、SCFは分化そのものを制御するというよりは、多くの種類の造血系細胞の生存を支持しながら、種々のサイトカインに対する反応性を高めると位置づけることができる。

25

トロンボポイエチン (TPO) もまた注目されている。この因子は、巨核球系

の分化と血小板産生を支持するが、幹細胞にも作用しその分化を誘導する。また、幹細胞の自己複製にも関与することが分かっている。

5 このように、従来の因子では、幹細胞の分化を促進することはなしえても、未分化のままその多能性を維持することができないという問題点があった。

従って、本発明は、幹細胞を未分化のまま（分化させずに）多能性を維持する方法および物質を提供することを課題とする。

10

発明の要旨

従って、本発明は、WIFドメインを有するタンパク質を提供する。より特定すると、このWIFドメインを有するタンパク質はWIF-1（例えば、配列番号2、4、6、8、10など）である。WIF-1のようなWIFドメインを有するタンパク質は、必要に応じてSCFのような幹細胞の生存を支持する因子とともに用いることによって、分化せずに多能性を保持した幹細胞を提供することができる。従来、WIFドメインを有するタンパク質はWNTタンパク質の機能を阻害することが示されていたが、幹細胞に作用して、その未分化性および多分化性を維持し、分化を停止させることは全く知られておらず、従ってこの事項は20 格別の効果ということができる。

本発明は、以下を提供する。

1. 幹細胞を分化させずにその多能性を維持する、WIFドメインを有するポリペプチド。

2. 上記W I F ドメインは、配列番号4に記載の配列の約30位～約180位のうちの少なくとも5アミノ酸を含む、項目1に記載のポリペプチド。

3. 上記W I F ドメインは、配列番号4に記載の配列の約30位～約180位を5含む、項目1に記載のポリペプチド。

4. 上記ポリペプチドは、EGF様リピートをさらに含む、項目1に記載のポリペプチド。

10 5. 上記EGF様リピートは、CX3CX5CX5CXCX8CX4からなる少なくとも1つのリピートを含み、ここで、Cはシスティンであり、Xは任意のアミノ酸を表す、項目4に記載のポリペプチド。

15 6. 上記ポリペプチドは、配列番号4に示される配列を有する、項目1に記載のポリペプチド。

7. 上記幹細胞は、造血幹細胞である、項目1に記載のポリペプチド。

8. 幹細胞を分化させずに多能性を維持するための組成物であって、上記組成物20は、W I F ドメインを有するポリペプチドを含む、組成物。

9. 上記ポリペプチドは、EGF様リピートをさらに有する、項目8に記載の組成物。

25 10. 上記ポリペプチドは、配列番号4に示される配列を有する、項目8に記載の組成物。

11. さらに、幹細胞生存因子を含む、項目8に記載の組成物。

12. 上記幹細胞生存因子はSCFである、項目8に記載の組成物。

5

13. インビトロで分化せず、かつ、多能性を保持する、幹細胞。

14. 造血幹細胞である、項目13に記載の幹細胞。

10 15. 上記多能性を保持する期間は、少なくとも6日間である、項目13に記載の幹細胞。

16. 上記多能性は、血液細胞への分化能を包含する、項目13に記載の幹細胞。

15 17. 長期多能性保持細胞組成物であって、幹細胞；およびWIFドメインを有するポリペプチド、を包含する、長期多能性保持細胞組成物。

18. 上記ポリペプチドは、EGF様リピートをさらに含む、項目17に記載の長期多能性保持細胞組成物。

20

19. 上記幹細胞は、造血幹細胞である、項目17に記載の長期多能性維持細胞組成物。

25 20. 上記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、項目17に記載の長期多能性保持細胞組成物。

21. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に記載の配列を含む、項目17に記載の長期多能性保持細胞組成物。

22. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも0.1ng/5m1存在する、項目17に記載の長期多能性保持細胞組成物。

23. さらに、幹細胞生存因子を含む、項目17に記載の長期多能性保持細胞組成物。

10 24. 上記幹細胞生存因子はS C Fである、項目23に記載の長期多能性保持細胞組成物。

25. 上記幹細胞生存因子はF L T-3 リガンドである、項目23に記載の長期多能性保持細胞組成物。

15 26. 上記幹細胞生存因子は、少なくとも1ng/m1存在する、項目23に記載の組成物。

27. 分化細胞を調製するための、項目23に記載の組成物であって、上記分化細胞は、血液細胞の障害を処置するために使用される、組成物。

28. 幹細胞を分化させずに、多能性を維持させる方法であって、

1) 上記幹細胞にW I F ドメインを有するポリペプチドを提供する工程、を包含する、方法。

25 29. 上記ポリペプチドは、EGF様ドメインをさらに含む、項目27に記載の

方法。

30. 上記幹細胞は、造血幹細胞である、項目27に記載の方法。

5 31. 上記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、項目27に記載の方法。

32. 上記WIFドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示す配列を含む、項目27に記載の方法。

10 33. 上記WIFドメインを有するポリペプチドは、少なくとも $0.1\text{ ng}/\text{mL}$ 存在する、項目27に記載の方法。

34. さらに、

15 2) 幹細胞生存因子を上記幹細胞に提供する工程、
を包含する、項目27に記載の方法。

35. 上記幹細胞生存因子はSCFである、項目34に記載の方法。

36. 上記幹細胞生存因子はFLT-3リガンドである、項目34に記載の方
20 法。

37. 上記幹細胞生存因子は、少なくとも $1\text{ ng}/\text{mL}$ 存在する、項目34に
記載の方法。

25 38. 長期多能性保持細胞組成物を生産する方法であって、
1) 幹細胞を提供する工程、

2) 上記幹細胞にW I F ドメインを有するポリペプチドを提供する工程、および

3) 処理された上記幹細胞を収集する工程、
を包含する、方法。

5

3 9. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、EGF様リピートをさらに
含む、項目3 8に記載の方法。

4 0. 上記幹細胞は、造血幹細胞である、項目3 8に記載の方法。

10

4 1. 上記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、項目3 8に記載の方法。

4 2. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示される配列
を含む、項目3 8に記載の方法。

15

4 3. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも0.1 n g/
m l 存在する、項目3 8に記載の方法。

4 4. さらに、

20 2) 幹細胞生存因子を上記幹細胞に提供する工程、
を包含する、項目3 8に記載の方法。

4 5. 上記幹細胞生存因子はS C F である、項目4 4に記載の方法。

25 4 6. 上記幹細胞生存因子はf 1 t - 3 リガンドである、項目4 4に記載の方
法。

4 7. 上記幹細胞生存因子は、少なくとも 1 n g / m l 存在する、項目 4 4 に記載の方法。

5 4 8. 分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置する方法であって、
1) 被検体に長期多能性保持細胞組成物を投与する工程であって、上記長期多能性保持細胞組成物は、

幹細胞；および

W I F ドメインを有するポリペプチドを包含する、工程、

10 を包含する、方法。

4 9. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、EGF様リピートをさらに含む、項目 4 8 に記載の方法。

15 5 0. 上記分化細胞は血液細胞である、項目 4 8 に記載の方法。

5 1. 上記幹細胞は、造血幹細胞である、項目 4 8 に記載の方法。

5 2. 上記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、項目 4 8 に記載の方法。

20 5 3. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に示される配列を含む、項目 4 9 に記載の方法。

5 4. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも 0. 1 n g / m
25 l 存在する、項目 4 9 に記載の方法。

5 5. 上記長期多能性保持細胞組成物は、幹細胞生存因子をさらに含む、項目 4
9 に記載の方法。

5 6. 上記幹細胞生存因子は S C F である、項目 5 5 に記載の方法。

5

5 7. 上記幹細胞生存因子は f 1 t - 3 リガンドである、項目 5 5 に記載の方
法。

5 8. 上記幹細胞生存因子は、少なくとも 1 n g / m l 存在する、項目 5 5 に記
10 載の方法。

5 9. 上記幹細胞を分化させる工程をさらに包含する、項目 4 9 に記載の方法。

6 0. 上記被検体は、ヒトである、項目 4 9 に記載の方法。

15

6 1. 上記 W I F - 1 ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に示される
配列を含むヒト組換え W I F - 1 である、項目 4 9 に記載の方法。

6 2. 分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置するための医薬組成物で
20 あって、

幹細胞；

W I F ドメインを有するポリペプチド；および

薬学的に受容可能なキャリア、

を含む、医薬組成物。

25

6 3. 上記ポリペプチドは、 E G F 様リピートをさらに含む、項目 6 2 に記載の

医薬組成物。

6 4. 上記分化細胞は血液細胞である、項目 6 2 に記載の医薬組成物。

5 6 5. 上記幹細胞は、造血幹細胞である、項目 6 2 に記載の医薬組成物。

6 6. 上記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、項目 6 2 に記載の医薬組成物。

10 6 7. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、W I F – 1 である、項目 6 2 に記載の医薬組成物。

6 8. 上記W I F ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも 0. 1 n g / m l 存在する、項目 6 2 に記載の医薬組成物。

15

6 9. 幹細胞生存因子をさらに含む、項目 6 2 に記載の医薬組成物。

7 0. 上記幹細胞生存因子はS C F である、項目 6 9 に記載の医薬組成物。

20 7 1. 上記幹細胞生存因子は f 1 t – 3 リガンドである、項目 6 9 に記載の医薬組成物。

7 2. 上記幹細胞生存因子は、少なくとも 1 n g / m l 存在する、項目 6 9 に記載の医薬組成物。

25

7 3. 上記疾患または障害がヒトの疾患または障害である、項目 6 2 に記載の医

薬組成物。

74. 上記WIF-1ドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示される配列を含むヒト組換えWIF-1である、項目62に記載の医薬組成物。

5

75. 幹細胞を分化させずに、多能性を維持させるための、WIFドメインを有するポリペプチドの使用。

76. 上記ポリペプチドは、EGF様リピートをさらに含む、項目75に記載の使用。

10

77. 上記幹細胞は、造血幹細胞である、項目75に記載の使用。

78. 上記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、項目75に記載の使用。

15

79. 上記WIFドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示される配列を含む、項目75に記載の使用。

20

80. 上記WIFドメインを有するポリペプチドは、少なくとも0.1ng/ m^l 存在する、項目75に記載の使用。

81. 幹細胞生存因子と組み合わせた、項目75に記載の使用。

82. 上記幹細胞生存因子はSCFである、項目81に記載の使用。

25

82. 上記幹細胞生存因子はf1t-3リガンドである、項目81に記載の使

用。

83. 上記幹細胞生存因子は、少なくとも1ng/ml存在する、項目81に記載の使用。

5

84. 上記疾患または障害は、ヒトの疾患または障害である、項目75に記載の使用。

85. 上記WIF-1ドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示される配列を含むヒト組換えWIF-1である、項目75に記載の使用。

図面の簡単な説明

15 図1(図1Aおよび1B)は、WIF-1遺伝子のドメイン別領域を示す。上からマウス、ヒト、ラット、Xenopus、Zebrafishの配列(それぞれ、配列番号2、4、6、8および10)である。アミノ酸残基のほぼ30位～ほぼ180位は、本明細書において定義されるWIFドメインである。アミノ酸残基のほぼ180位以降にはEGF様リピートが存在する。

20

図2は、FACSを用いたCD34-KSL細胞の純化方法を示すスキームである。

25 図3は、Lin-およびc-Kit+/Scal-1+で展開したFACS図を示す。

図4は、単細胞培養法（single cell culture）を示すスキームである。この方法で調製した細胞の生存率、細胞分裂およびコロニー形成を本明細書に記載の方法により調査することができる。

5 図5は、マウスを利用した幹細胞を調べるためのスキームを示す。

発明の詳細な説明

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の冠詞（例えば、
10 英語の場合は「a」、「an」、「the」など、独語の場合の「ein」、「der」、「das」、「die」などおよびその格変化形、仏語の場合の「un」、「une」、「le」、「la」など、スペイン語における「un」、「una」、「el」、「la」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

（配列の説明）

配列番号1は、本発明のマウスWIF-1の全長スクレオチド配列を示す。
20 配列番号2は、本発明のマウスWIF-1の全長アミノ酸配列を示す。
配列番号3は、本発明のヒトWIF-1の全長スクレオチド配列を示す。
配列番号4は、本発明のヒトWIF-1の全長アミノ酸配列を示す。
配列番号5は、本発明のラットWIF-1の全長スクレオチド配列を示す。
配列番号6は、本発明のラットWIF-1の全長アミノ酸配列を示す。
25 配列番号7は、本発明のXenopus WIF-1の全長スクレオチド配列を示す。

配列番号 8 は、本発明の *Xenopus WIF-1* の全長アミノ酸配列を示す。

配列番号 9 は、本発明の *Zebrafish WIF-1* の全長ヌクレオチド配列を示す。

5 配列番号 10 は、本発明の *Zebrafish WIF-1* の全長アミノ酸配列を示す。

配列番号 11 は、実施例 1 で使用した縮重プライマー（順向き）の配列を示す。

配列番号 12 は、実施例 1 で使用した縮重プライマー（逆向き）の配列を示す。

配列番号 11 および 12 を含め本明細書において、使用される核酸表記は、以下
10 のとおりである。a : アデニン； c : シトシン； g : グアニン； t : チミン；
u : ウラシル； m : A または C； r : G または A； w : A または T もしくは U；
s : G または C； y : T もしくは U または C； k : G または T もしくは U； v :
A または G または C； h : A または C または T もしくは U； d : A または G または
15 T もしくは U； b : G または C または T もしくは U； および n : (A または C
または G または T もしくは U) または (不明または他の塩基)。

配列番号 13 は、pCAGGS-6His ベクターの配列を示す。

配列番号 14、16、18、20 は、本発明の WIF ドメインを有するポリペ
19 プチドの保存的置換改変体のヌクレオチド配列を示し、配列番号 15、17、1
9、21 は、本発明の WIF ドメインを有するポリペプチドの保存的置換改変体
20 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 22 は、WIF ドメインのみを含む改変体のヌクレオチド配列を示し、

配列番号 23 は、WIF ドメインのみを含む改変体のアミノ酸配列を示す。

配列番号 24 は、EGF 様リピートのみを含む改変体のヌクレオチド配列を示し、配列番号 25 は、EGF 様リピートのみを含む改変体のアミノ酸配列を示す。

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。

5

本発明では、通常幹細胞が使用され得るが本発明の因子による処理によって多能性を獲得し未分化状態になることができる細胞であれば、どのような細胞でも使用することができる。「幹細胞」とは、自己複製能と多分化能を有した細胞と定義され、実際には組織が傷害を受けたときに少なからずその組織を再生することができる細胞をいう。本明細書において、幹細胞の「生」とは未分化状態のまま多能性を失うことなく生存ないし増殖すること意味し、幹細胞の「死」とは分化ないしアポトーシスに至る現象を意味する。本発明において使用される幹細胞は、胚性幹細胞（E S）または組織幹細胞（組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう）であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。従って、本発明の1つの好ましい実施形態では、細胞として胚性幹細胞（Embryonic stem cells および Embryonic germ cells）が使用され得る。別の好ましい実施形態では、組織幹細胞（例えば、造血幹細胞）が使用され得る。

組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が比較的限定されている細胞であり、組織中に存在し、未分化な細胞内構造をしている。組織幹細胞は、核／細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。従って、本発明の1つの好ましい実施形態において、細胞として血液細胞へと方向付けられた組織

幹細胞が使用され得る。

組織幹細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉、内胚葉由来の幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の組織幹細胞には、脳に存在する神経幹細胞や皮膚存在にする表皮幹細胞や毛包幹細胞さらに色素幹細胞が含まれる。中胚葉由来の組織幹細胞には、骨髓中および血液中に認められるに血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞が含まれる。内胚葉由来の組織幹細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、脾幹細胞、腸管上皮幹細胞が含まれる。そのほかに精巣および卵巣には germ line stem が存在する。本発明の好ましい実施形態では、中胚葉由来の幹細胞が使用され得る。本発明のより好ましい実施形態では、造血幹細胞が使用され得る。

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髓系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛囊幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、脾（共通）幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髓系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。血液細胞は造血幹細胞に由来することから、本発明の 1 つの実施形態では、造血幹細胞が使用され得る。

20

造血幹細胞は、幹細胞の中では最も研究されている幹細胞のひとつである。しかし、造血幹細胞については、例えばその可塑性など、解明すべき点も多く残っている。造血幹細胞の同定には確立された移植実験系が不可欠である。造血幹細胞の研究にはもっぱらマウスモデルが用いられている。造血幹細胞は、10 万個の骨髓細胞中に約 3 ~ 4 個の頻度で存在する（B6 マウスの場合）。造血幹細胞を実験または医療において応用する場合、他の骨髓細胞から分離することが必要

となる。造血幹細胞純化のために現在最も効率的な方法は、骨髄細胞を種々の細胞表面抗原に対する蛍光標識された抗体で染色し、F A C S (f l u o r e s c e n s e a c t i v a t e d c e l l s o r t e r) を用いてそれぞれの抗原に対して陽性または陰性の細胞画分にわけ、造血幹細胞の存在する画分を選択することによって、造血幹細胞を濃縮する方法である。

骨髄中の造血幹細胞は、CD 34 陰性または弱陽性、c - K i t 陽性、S c a - 1 陽性、l i n e a g e マーカー陰性 (CD 34⁻ K S L) 細胞分画に高頻度に存在する。競合的骨髄再構築法 (c o m p e t i t i v e r e p o p u l a t i o n a s s a y) を用いて、CD 34⁻ K S L 細胞 1 個をマウスに移植するとレシピエントマウスのおよそ 3 匹中に 1 匹の割合で長期の造血系再構築が起こることが知られており、CD 34⁻ K S L 細胞の 3 個に 1 個は造血幹細胞であるといえる (実験医学、V o l . 1 9 N o . 1 5 (増刊) 5 5 - 5 9 2 0 0 1)。再構築レベルが不均一であることから、造血幹細胞集団は均一ではないようである。この造血幹細胞濃縮画分は、充分に実験室レベルおよび臨床レベルで使用することが可能である。

本発明では、そのように濃縮または純化した造血幹細胞集団を細胞供給源として用いることができる。

20

本明細書において「分化 (した) 細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞 (例えば、筋細胞、神経細胞、血液細胞など) をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、臍実質細胞、臍管細胞、肝細胞、胆管細胞、血液細胞 (例えば、赤血球、血小板、T 細胞、B 細胞など) 、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞など

が挙げられる。従って、本発明の1つの実施形態において、ある分化細胞を本発明の因子で処理することによって、分化せず、かつ、多能性を獲得することができる場合、そのような分化細胞もまた本発明の範囲内にある。本発明の幹細胞から調製した分化細胞もまた、種々の疾患および障害の治療および／または予防に利用することができる。従って、分化細胞および分化細胞を含む組成物もまた本発明の範囲内に入る。そのような分化細胞は、本発明の幹細胞に分化因子（例えば、EPO、種々のインターロイキン（IL-3）のような造血因子など）を適用することによって調製することができる。本明細書において「分化因子」とは、幹細胞に作用して、分化を促進させる因子（例えば、ポリペプチドなど）をいう。

分化因子の例としては、例えば、種々のインターロイキン（IL-3、IL-6、IL-11など）、コロニー刺激因子（EPO、TPO、G-CSF、GM-CSF、M-CSFなど）のようなサイトカインなど、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor）（HGF）、上皮増殖因子（epidermal Growth Factor）（EGF）、血管内皮増殖因子（vascular Endothelial growth factor）（VEGF）、血小板由来増殖因子（Platelet-Derived Growth factor）（PDGF）、線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor）（FGF）のような各種増殖因子などが挙げられる。

20

本明細書において「単離（された）」とは、ある物質または細胞の状態についてい、その物質または細胞が天然に存在する状態とは別の状態にあることをい、その物質または細胞が天然に存在するときに付随する少なくとも1つの物質または細胞が伴わない状態をいう。本明細書において、細胞を「濃縮」するとは、ある特定の細胞の存在頻度を天然に存在する頻度より高くすることをいう。本明細書において細胞を「純化する」とは、その細胞の存在頻度が高い状態にするこ

とであって、実質的にその細胞以外の細胞が、その細胞の機能に影響を与えない程度で存在させることをいう。従って、好ましい状態では、純化された細胞または細胞組成物は、ある特定の細胞のみを含む。本明細書において物質を「精製する」とは、その物質の存在頻度が高い状態にすることであって、実質的にその物質以外の物質が、その物質の機能に影響を与えない程度で存在させることをいう。
5 従って、好ましい状態では、純化された物質または物質を含む組成物は、ある特定の物質のみを含む。

また、本発明の多能性を有する細胞は、その細胞が造血幹細胞である場合、少なくとも 1 つの血球・リンパ球系細胞 (T 細胞、B 細胞、形質細胞、好塩基球、好酸球、単球、マクロファージ、好中球、巨核球、血小板、赤芽球、赤血球など) へと分化することができ、好ましくは本発明の多能性を有する細胞は、すべての血球・リンパ球系細胞へと分化することができる。従って、本発明の好ましい分化細胞は、T 細胞、B 細胞、形質細胞、好塩基球、好酸球、単球、マクロファージ、好中球、巨核球、血小板、赤芽球、赤血球などの血球・リンパ球系リンパ系細胞であり得る。
10
15

本明細書において、「分化」または「細胞分化」とは、1 個の細胞の分裂によって由来した娘細胞集団の中で形態的・機能的に質的な差をもった二つ以上のタイプの細胞が生じてくる現象をいう。従って、元来特別な特徴を検出できない細胞に由来する細胞集団 (細胞系譜) が、特定のタンパク質の産生などはつきりした特徴を示すに至る過程も分化に包含される。現在では細胞分化を、ゲノム中の特定の遺伝子群が発現した状態と考えることが一般的であり、このような遺伝子発現状態をもたらす細胞内あるいは細胞外の因子または条件を探索することにより細胞分化を同定することができる。細胞分化の結果は原則として安定であって、特に動物細胞では、別の型の細胞に分化することは例外的にしか起こらない。従
20
25

って、「未分化（状態）」とは、形態的・機能的に質的な差を未だ持たない細胞の状態をいう。

本明細書において、「多能性」とは、細胞の性質をいい、種々の組織または器官（臓器）に属する細胞に分化し得る能力をいう。通常、細胞の多能性は発生が進むにつれて制限され、成体では一つの組織または器官を構成する分化細胞が別の組織または器官の細胞に変化することは少ない。したがって多能性は通常失われている。これが起きる場合通常病的な状態であり、化生（metaplasia）と呼ばれる。しかし間葉系細胞では比較的単純な刺激で他の間葉性細胞にかわり化生を起こしやすいので多能性の程度は高い。本明細書において、「多能性を維持する」とは、幹細胞などの細胞の多能性保つことをいう。本発明は、通常の幹細胞よりも長く多能性を維持する幹細胞を生産することを達成した画期的な発明である。

本発明で用いられる細胞は、どの生物由来の細胞（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）でもよい。好ましくは、脊椎動物由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類由来の細胞が用いられる。最も好ましくはヒト由来の細胞が用いられる。

本明細書において、「WIFドメイン」とは、WIF-1のシグナルペプチドを除いたN末端領域のうち、EGF様リピートが始まるまでの領域をいう。従つて、マウスWIFドメインの場合は、配列番号1においてアミノ酸番号が約30位～約180位までが相当する。本明細書では、「WIFドメイン」は、配列番号2に示される配列のアミノ酸番号の約30位～約180位と同一のもののほか、配列番号4に示されるヒトWIFドメインの約30位～約180位と同一のもの、

配列番号 8 に示される *Xenopus* の WIF ドメインの約 30 位～約 180 位と同一のもの、配列番号 10 に示される *Zebrafish* の WIF ドメインの約 30 位～約 180 位と同一のもの、ならびにそれらに類似する配列をも含む。ここで類似する配列とは、好ましくは、上記マウス、ヒト、*Xenopus* および *Zebrafish* の WIF ドメインから選択される 1 つの配列に示される配列の保存的置換体をいう。保存的置換は下記に定義される。本発明においては、通常、上記長さの WIF ドメインを有するポリペプチドが用いられるが、それより短い WIF ドメインの部分を含むポリペプチドも用いることができる。そのようなより短い WIF ドメインを含むポリペプチドが WIF ドメインの機能を有するかどうかは、Hsieh J. H., et al., *Nature* 398, 431-436, 1999 に記載される *Wnt* たのインピトロ阻害活性アッセイを用いて判定することができる。従って、そのようなより短い WIF ドメインは、配列番号 2 に示される配列のアミノ酸番号の約 30 位～約 180 位と同一のものほか、配列番号 4 に示されるヒト WIF ドメインの約 30 位～約 180 位と同一のもの、配列番号 8 に示される *Xenopus* の WIF ドメインの約 30 位～約 180 位と同一のもの、配列番号 10 に示される *Zebrafish* の WIF ドメインの約 30 位～約 180 位のうち、少なくとも 5 アミノ酸、6 アミノ酸、7 アミノ酸、8 アミノ酸、9 アミノ酸、10 アミノ酸、11 アミノ酸、12 アミノ酸、13 アミノ酸、14 アミノ酸、15 アミノ酸、20 アミノ酸、25 アミノ酸、30 アミノ酸、40 アミノ酸、50 アミノ酸、60 アミノ酸、70 アミノ酸、80 アミノ酸、90 アミノ酸、100 アミノ酸、110 アミノ酸、120 アミノ酸、130 アミノ酸、140 アミノ酸または 150 アミノ酸を含み得る。本明細書において、WIF ドメインを有するポリペプチドで好ましいものは WIF-1 である。WIF-1 のアミノ酸配列は、本明細書において、配列番号 2、4、6、8 および 10 (それぞれ、マウス、ヒト、ラット、*Xenopus* および *Zebrafish*) があり、これらは、種間でよく保存されている (図 1 を参照のこと)

と)。

本明細書において、「EGF様リピート」とは、上皮増殖因子（Epidermal Growth Factor）において特徴的なドメインをいう。6つ
5 のシステインを1単位とする重複配列で、上皮増殖因子（EGF）では、「CX₇CX₄-5CX₁₀-13CX₈C（Xは任意のアミノ酸）」からなる
リピートを9つ有する。本明細書において有用なポリペプチドは、好ましくは、少なくとも1つのEGF様リピートを含み、より好ましくは、2、3、4または
10 5つのEGF様リピートを含み得る。WIF-1は、「CX₃CX₅CX₅CX₈CX₄（Xは任意のアミノ酸）」からなるリピートを5つ有する。本発明
のWIF-1ポリペプチドには、EGF様リピートが5個存在し、その位置は、マウスWIF-1ポリペプチド（配列番号2）の場合、182～213、214
～245、246～277、278～309、310～341にある。EGF様
リピートを有するポリペプチドとしては、notch-1、notch-2、j
15 aggded-1、D11-1、DLKなどが挙げられる。EGF様リピートを有
するポリペプチドは、ひろく幹細胞の分化制御に関わることは示されていた（WO9731647A1）が、造血幹細胞を、その分化を停止または遅延させつつ
（すなわち未分化のまま）多能性を保持させる活性がWIF-1に見い出された
のは本発明が初めてであり、その技術的意義は大きい。

20

本発明のWIF-1ポリペプチドのシステイン残基は、配列番号2の140位、177位、182位、186位、192位、198位、200位、209位、214位、218位、224位、230位、232位、241位、246位、250位、256位、262位、264位、273位、278位、282位、288位、294位、296位、305位、310位、314位、320位、326位、328位、337位に存在する。これらは種間で保存されている。

また、糖鎖が付加され得る部分としては、N-アセチル-D-グルコサミンがN-グルコシド結合可能な部分として、配列番号2の120位、158位、170位、193位、220位、240位、245位、252位、284位、324位、338位などが挙げられる。これらもまた種間で保存されている。また、N-アセチル-D-ガラクトサミンのO-グリコシド結合をする部分としては、セリンまたはスレオニン残基が頻出する部分が挙げられる。これらの糖鎖が付加されたタンパク質は、通常生体内での分解に対して安定であり、強い生理活性を有し得る。従って、これら糖鎖が付加されたポリペプチドもまた、本発明の範囲内にある。

本発明のポリペプチドは、任意の生物由来であり得る。好ましくは、その生物は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、爬虫類、両生類、魚類、鳥類など）であり、より好ましくは、哺乳動物（例えば、齧歯類（マウス、ラットなど）、霊長類（ヒトなど）など）であり得る。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、合成されたものであってもよい。アミノ酸を合成する方法は、当該分野において周知である。そのような合成方法としては、ペプチド合成機（例えば、Applied Biosystemsから入手可能）などを利用した方法が挙げられる。

本発明のポリペプチドは、抗体のヒンジ領域部分のみとの融合タンパク質を発現させて、ジスルフィド結合にて2量体を形成させる方法、もしくは活性に影響を与えないほかの方法でジスルフィド結合を生じさせる形態で、C末端、N末端または他の場所において発現するように作製された融合タンパク質を含む二量体以上高い比活性を有する多量体型ポリペプチドもまた利用され得る。また、配列番号2のような本発明の配列を直列で並べて多量体構造を持たせる方法も本発明において利用可能である。従って遺伝子工学技術により作製される任意の二量体

またはそれを超える形態は、本発明の範囲内にある。

本明細書において「幹細胞生存因子」とは、幹細胞の生存に必須の因子をいう。従来、幹細胞の生存（および分化）には、SCFが必要と考えられていた。しかし、Ornitz M., et al. (Immunity, Vol. 10, 173-182, 1999) は、SCFのレセプターであるc-Kitを発現しない多能性造血幹細胞を発見した。従って、SCF自体が全ての幹細胞生存に必須であるとは限らないことが示されている。従って、当業者は、幹細胞生存因子は、幹細胞に依存して変動することを認識する。幹細胞生存因子としては、SCF、TPO、flt-3リガンドなどが挙げられる。1つの実施形態では、幹細胞生存因子は、SCF (stem cell factor (幹細胞因子)、steel factorとしても知られる) であり得る。SCFは、幹細胞の機能を制御する因子として同定された。しかし、本明細書において示されるように、SCF自体には幹細胞の自己複製に関連する活性はなく、むしろ、c-Kitレセプターを有する細胞についてその生存を支持するものの、結果的には細胞を分化の方向へ向けてしまうことが明らかとなった。従って、SCFは、幹細胞生存因子の一種として働くものと考えられ、本明細書においては、SCFは幹細胞生存因子の好ましい例として記載される。

また、従来CD34陽性は多能性の有力なマーカーと考えられており、このマーカーの発現をもって多能性を有することの指標とされていたが、本明細書において多能性とは必ずしも相関しないことが示された。従って、本発明において、WIFドメインを有するタンパク質が幹細胞の分化をさせずに多能性を維持する機能を有することが見出されたことは驚くべき効果であるといえる。

25

NotchのリガンドとしてJagged-1が知られている (J. Exp.

Med. 192, 1365-1372, 2000)。ここでは、Jagged-1は造血細胞との関連は示されていたが、これ単独ないしSCFとの共存下で未分化のまま多能性を保持させることは見出されていなかった。

5 TPOのような造血因子もまた、造血幹細胞における分化制御に関連があることが示されている。Blood, 1 October 2001, Vol. 98, No. 7, pp. 2091-2100 では、造血因子による正常臍帯血および骨髄CD34陽性細胞におけるアポトーシス抑制因子群のsurvivinの役割が示された。その中で、TPO、Flt3 ligand (FL)、SCFの組合せが24時間以内にCD34+細胞のsurvivinの発現を上方制御することが示されている。また、細胞周期に入ることとsurvivinの発現が同期することが示唆されている。しかし、細胞分化との関連は検討されていない。

15 本明細書において、「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、互換的に用いられ、一連のアミノ酸からなる高分子（重合体）をいう。アミノ酸は、炭素原子にカルボキシル基およびアミノ基を有する有機分子をいう。本明細書において好ましくは、アミノ酸は、天然に存在する20種類のアミノ酸であるがこれらに限定されない。

20 本明細書において、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、特に言及する場合を除き互換的に用いられ、一連のヌクレオチドからなる高分子（重合体）をいう。ヌクレオチドとは、部分がリン酸エステルになっているヌクレオシドをいう。塩基部分としては、ピリミジン塩基またはプリン塩基のヌクレオチド（ピリミジンヌクレオチドおよびプリンヌクレオチド）がある。ポリヌクレオチドとしては、DNAまたはRNAが挙げられ

る。

本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば、そのポリペプチドを產生する初代培養細胞または株化細胞を培養し、培養上清などから単離または精5 製することが挙げられる。あるいは、遺伝子操作手法を利用して、そのポリペプチドをコードする遺伝子を適切な発現ベクターに組み込み、これを用いて発現宿主を形質転換し、この形質転換細胞の培養上清から組換え生理活性物質を得ることができ10る（例えば、細胞増殖因子）。上記宿主細胞は、そのポリペプチドを発現するものであれば、特に限定されず、従来から遺伝子操作において利用される各種の宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞など）を用いることが可能である。このようにして得られたポリペプチドは、天然型のポリペプチドと実質的に同一の作用を有する限り、アミノ酸配列中の1以上のアミノ酸が置換、付加および／または欠失していてもよく、1以上の糖鎖が置換、付加および／または欠失していてもよい。

15

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タン20 パク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

25 上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の

重要性は、一般に当該分野で認められている (K y t e. J およびD o o l i t t l e, R. F. J. M o l. B i o l. 1 5 7 (1) : 1 0 5 - 1 3 2, 1 9 8 2)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子 (例えば、酵素、基質、レセプター、D N A、5 抗体、抗原など) との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは: イソロイシン (+ 4. 5) ; パリン (+ 4. 2) ; ロイシン (+ 3. 8) ; フェニルアラニン (+ 2. 8) ; システイン/シスチン (+ 2. 5) ; メチオニン (+ 1. 9) ; アラニン (+ 1. 8) ; グリシン (- 0. 4) ; スレオニン (- 0. 7) ; セリ 10 ン (- 0. 8) ; トリプトファン (- 0. 9) ; チロシン (- 1. 3) ; プロリ ン (- 1. 6) ; ヒスチジン (- 3. 2) ; グルタミン酸 (- 3. 5) ; グルタ 15 ミン (- 3. 5) ; アスパラギン酸 (- 3. 5) ; アスパラギン (- 3. 5) ; リジン (- 3. 9) ; およびアルギニン (- 4. 5)) である。

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質 (例えば、酵素活性において等価なタンパク質) を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が ± 2 以内であることが好ましく、 ± 1 以内であることがより好ましく、および $\pm 0. 5$ 以内であることがさらにより好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4、554、101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている: アルギニン (+ 3. 0) ; リジン (+ 3. 0) ; アスパラギン酸 (+ 3. 0 ± 1) ; グルタミン酸 (+ 3. 0 ± 1) ; セリン (+ 0. 3) ; アスパラギン (+ 0. 2) ; グルタミン (+ 0. 2) ; グリシン (0) ; スレオニン (- 0. 4) ; プロリン (- 0. 5 ± 1) ; アラニン (- 0. 5) ; ヒスチジン (- 0. 5) ; システイン (- 1. 25)

0) ; メチオニン (-1. 3) ; バリン (-1. 5) ; ロイシン (-1. 8) ; イソロイシン (-1. 8) ; チロシン (-2. 3) ; フェニルアラニン (-2. 5) ; およびトリプトファン (-3. 4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0. 5以内であることがさらにより好ましい。

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または/および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、

これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。機能的に等価であるかどうかは、本明細書において記載される任意のアッセイを用いて指標となるポリペプチドと同じ機能を有するかを評価することにより判定することができる。

用語「ペプチドアナログ」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のアミノ酸アナログが付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能（例えば、pK_a値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど）と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。

本明細書において使用されるポリペプチドをコードする核酸分子は、発現されるポリペプチドが本発明のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていてもよい。あるいは、5'末端および/または3'末端に他の核酸が結合していてもよい。また、このポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような核酸分子を作製する方法は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

このような核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変異誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

5 本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編 (1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY；Sambrook J ら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。

15 本明細書において、核酸分子の「断片（フラグメント）」とは、参照核酸分子の全長よりも短く、本発明の因子としての使用に充分な長さを有するポリヌクレオチドをいう。したがって、本明細書におけるフラグメントは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さがn）に対して、1～n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、
20 その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここに具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここに具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11な

ど) もまた、下限として適切であり得る。

ある核酸分子の断片を、それが由來した元の核酸分子に対する選択的プローブまたは選択的プライマーとして使用するためには、特異的にハイブリダイズし得る断片である必要がある。本明細書においてあるDNAが「特異的にハイブリダイズ」するとは、提供された核酸分子を互いに区別して検出または增幅し得ることをいう。選択的プローブには、代表的には、少なくとも10ヌクレオチド長であり、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長であり、より好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長であり、さらに好ましくは少なくとも30、40または10
5 50ヌクレオチド長であり得、50を超えるヌクレオチド長も使用され得る。選択的プローブは、選択的プライマーを用いたPCR增幅産物として入手され得る。

1対のプライマーの少なくとも一方に、選択的プライマーをPCRに使用する場合、選択的プライマーは、代表的には少なくとも9ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも10ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、
10 さらに好ましくは少なくとも17、18、19、20、21、22、23、24、
15 25、30または50ヌクレオチド長であり得る。

遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、またはストリングエントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、9
20 6%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を
25 有する。

本明細書では塩基配列の同一性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

5 本明細書において、「ストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより、そのような
10 ポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38、DNA Cloning 1:Core Techniques, 20 A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。

25

「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下

で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、配列番号2, 4または6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましく5は80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。記載の相同性は、たとえばAltschulら (J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) が開発したアルゴリズムを使用した検索プログラムBLASTを用いることにより、scoreで類似度が示される。

10

「誘導体オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドをいう。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド20中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' -O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' -メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示さ25れども。

れる。

本明細書において、「アミノ酸」は、上述のように天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがも5とのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸は、当該分野において周知である。

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。10「誘導体ヌクレオチド」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドは、当該分野において周知である。

本明細書において、「エピトープ」とは、構造の明らかな抗原決定基をいう。エピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピト15一¹は、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。エピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸の長さの配20列が必要であり得る。

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能を発揮する²が包含される。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、25そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。本発明の1実施形態で

あるW I F ドメインを有するタンパク質の場合は、その生物学的活性は、W n t ファミリーのレセプターの少なくとも1つへの結合活性を包含する。

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。本明細書において、核酸分子の「ホモログ（種相同体）」とは、参照核酸分子のヌクレオチド配列と相同性を有するヌクレオチド配列を有する核酸分子をいう。ホモログは、代表的には、参照核酸分子と、ストリンジエント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドをいう。本発明の核酸分子についていう場合、「ホモログ」とは、そのタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列と相同性を有する核酸配列を有する核酸分子であって、その生物学的機能が本発明のプロモーターと同一または類似する核酸分子をいう。従って、「ホモログ」と「改変体」とは一部重複する概念である。従って、ホモログは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性）を有するものをいう。そのようなホモログを取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。例えば、本発明のW I F - 1 のホモログは、同じ種の相同遺伝子または他の種の対応する遺伝子であり得る。従って、本発明のW I F ドメインを有するタンパク質には、すべてのW I F - 1 のホモログが包含される。

入方法としては、細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換などが挙げられる（例えば、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）。

5

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」または「組換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。プロモーターとしては、大腸菌、酵母などの宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、*t r p*プロモーター（*P t r p*）、*l a c*プロモーター（*P l a c*）、*P L*プロモーター、*P R*プロモーター、*P S E*プロモーター等の、大腸菌およびファージ等に由来するプロモーター、*S P O 1*プロモーター、*S P O 2*プロモーター、*p e n P*プロモーター等を挙げることができる。また*P t r p*を2つ直列させたプロモーター（*P t r p x 2*）、*t a c*プロモーター、*l a c T 7*プロモーター、*I e t I*プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

20

原核細胞に対する「組換えベクター」としては、*p B T r p 2*、*p B T a c 1*、*p B T a c 2*（いずれもRoche Molecular Biochemicalsより市販）、*p K K 2 3 3 - 2*（Pharmacia）、*p S E 2 8 0*（Invitrogen）、*p G E M E X - 1* [Promega]、*p Q E - 8*（QIAGEN）、*p K Y P 1 0*（特開昭58-110600）、*p K Y P 2 0*

0 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLS
A1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pG
EL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1
985)]、pBluescript II SK+ (Stratagene)、
5 pBluescript II SK(-) (Stratagene)、pTr
s30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-540
8)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6
798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4
939094、US5160735)、pEG400 [J. Bacterio
10 1., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia)、p
ETシステム (Novagen)、pSupex、pUB110、pTP5、p
C194、pTrxFus (Invitrogen)、pMAL-c2 (New
England Biolabs)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1
985)]、pSTV28 (宝酒造)、pUC118 (宝酒造)、pPA1 (特
15 開昭63-233798) などが例示される。

酵母細胞に対する「組換えベクター」としては、YEpl3 (ATCC371
15)、YEpl24 (ATCC37051)、YCP50 (ATCC3741
9)、pHS19、pHS15などが例示される。

20 動物細胞に対する「組換えベクター」としては、pCDNA1/Amp、pC
DNA1、pCDM8 (いずれもフナコシより市販)、pAGE107 [特開平
3-229 (Invitrogen)、pAGE103 [J. Biochem.,
101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA [J. Biol. Ch
25 em., 268, 22782-22787 (1993)] などが例示される。

植物細胞に対する「組換えベクター」としては、*Ti*プラスミド、タバコモザイクウイルスベクターなどが例示される。

昆虫細胞に対する「組換えベクター」としては、*pVL1392*、*pVL1393*、*pBlueBacIII*（すべてInvitrogen）などが例示される。

「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、
10 昆虫細胞などが例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。

原核生物細胞としては、*Escherichia*属、*Serratia*属、*Bacillus*属、*Brevibacterium*属、*Corynebacterium*属、*Microbacterium*属、*Pseudomonas*属などに属する原核生物細胞、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No. 49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Escherichia coli* BL21 (DE3)、*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS、*Escherichia coli* HMS174 (DE3)、*Escherichia coli* HMS174 (DE3) pLysS、*Ser*

ratia ficaria, Serratia fonticola, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14067, Corynebacterium glutamicum ATCC13869, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354, Pseudomonas sp. D-0110などが例示される。

酵母細胞としては、Saccharomyces属、Schizosaccharomyces属、Kluyveromyces属、Trichosporon属、Schwanniomyces属、Pichia属などに属する酵母菌株を挙げることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Trichosporon pullulan, Schwanniomyces alluvius, Pichia pastorisなどを挙げができる。組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteri

o 1. , 153, 163 (1983)] 、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法などが例示される。

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、5 BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HTB 5637 (特開昭63-299) 、ヒト大腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、PS20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293 (ATCC: 10 CRL-1573) など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15などが例示される。

植物細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ダイズ、15 トマト、ニンジン、コムギ、オオムギ、ライムギ、アルファルファ、アマなどの植物細胞などを挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、Agrobacterium法 (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977) 、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887) 、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、20 特許第2517813) などが例示される。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞などを用いることができる。*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (Baculovirus Expression

Vectors: A Laboratory Manual) など、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞としては High 5、BTI-TN-5B 1-4 (Invitrogen) など、カイコ卵巣由来の培養細胞としては *Bombyx mori* N4 などが例示される。

5

ポリペプチドまたはその塩の製造法は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができ、例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、その培養物より本発明のポリペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

10 「抗体」とは、当該分野で通常使用される意味で用いられ、本明細書においては、抗体の全部およびそのフラグメント、誘導体、結合体なども包含する。好ましくは、本発明のポリペプチドを認識する抗体であり、より好ましくは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体である。そのような抗体は、ポリクローン抗体またはモノクローナル抗体のいずれでもよい。

15 本発明の因子によって調製された細胞または細胞組成物は、生物への移入に適した形態であれば、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。投与経路としては経口投与、非経口投与、患部への直接投与などが挙げられる。

20 注射剤は当該分野において周知の方法により調製することができる。例えば、適切な溶剤（生理食塩水、PBS のような緩衝液、滅菌水など）に溶解した後、フィルターなどで濾過滅菌し、次いで無菌容器（例えば、アンプルなど）に充填

することにより注射剤を調製することができる。この注射剤には、必要に応じて、慣用の薬学的キャリアを含めてもよい。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法も使用され得る。

5 1つの実施形態において、本発明の因子は、徐放性形態で提供され得る。徐放性形態の剤型は、本発明において使用され得る限り、当該分野で公知の任意の形態であり得る。そのような形態としては、例えば、ロッド状（ペレット状、シリンダー状、針状など）、錠剤形態、ディスク状、球状、シート状のような製剤であり得る。徐放性形態を調製する方法は、当該分野において公知であり、例えば、
10 日本薬局方、米国薬局方および他の国の薬局方などに記載されている。徐放剤（持続性投与剤）を製造する方法としては、例えば、複合体から薬物の解離を利用する方法、水性懸濁注射液とする方法、油性注射液または油性懸濁注射液とする方法、乳濁製注射液（o/w型、w/o型の乳濁製注射液など）とする方法などが挙げられる。

15 本明細書においてポリペプチド発現の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンプロット法、ドットプロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法
20 としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンプロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。

25 「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンプロット法、免疫組織染色法などの免

疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンプロット法、ドットプロット法、P C R法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのm R N A レベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはm R N A レベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

(発明を実施する最良の形態)

10 1つの局面において、本発明は、幹細胞を未分化のままか分化を抑制しつつ多能性を維持する、W I F ドメインを有するポリペプチドを提供する。ここで、未分化のまま（または分化させない）とは、未分化状態を保つか、またはほとんど分化させないことをいう。従って、分化しないことと、未分化であること、および分化を抑制することは本明細書において同義である。また、分化していないとは、生物の発生初期において一つ一つの細胞や細胞群が何ら形態的または機能的特徴を示さず区別しがたい状態である。

1 1つの実施形態において、本発明のポリペプチドは、W I F - 1 である。W I F - 1 は好ましくは、配列番号2（マウス）、配列番号4（ヒト）、配列番号6（ラット）、配列番号8（X e n o p u s）または配列番号10（Z e b r a f i s h）に示される配列含む。より好ましくは、本発明のポリペプチドは、配列番号4に示される配列またはその改変体の配列を含む。さらに好ましくは、本発明のポリペプチドは、配列番号4に示される配列を含む。W I F - 1 は、W n t i n h i b i t o r y f a c t o r - 1 の略で、W n t タンパク質に結合し、25 その活性を阻害する新規分泌タンパク質として、1999年に初めて報告された（H s i e h J. H. , et a l. , N a t u r e 398, 431-43

6, 1999)。Hsiehらは、ヒト、マウス、*Xenopus*および*Zebrafish*でこのWIF-1の遺伝子産物およびその発現パターンを同定し、Wntタンパク質のインピトロでの阻害活性を示した。Hsiehらの報告ではさらに、*Xenopus*で体節・体軸形成活性を阻害することが示された。しかし、
5 他の生物での活性は示されなかった。

Wntは、胎生期の体軸形成および器官形成を制御する因子として知られている(Cadigan K. M., and Nusse R., *Genes & Development* 11:3286-3305)。Wntは、別々の研究
10において、マウス(当初int-1と呼ばれていた)、昆虫(*Drosophila*; *wg* (wingless)と呼ばれていた)で見出されたが、後になって、線虫(*C. elegans*)、ヒトを含む哺乳動物、両生類などのような広範囲の脊椎動物にも存在することが見出された。しかし、Wntには、Wnt-1など20種類程度ホモログが存在し、各々の機能が多岐にわたる。ある種のWnt
15は細胞質内での β カテニンの安定化およびそれに伴う遺伝子発現を介していると考えられているが、癌形成に関与していると示唆されているWntもあり、Wnt全体としての機能は混沌としている。Wntと相互作用するタンパク質として、*Fz* (*Frizzled*) レセプターが知られているが、その作用機能は種々説
があり、解明されていない。

20

従って、WIF-1は、Wntの阻害活性を有する因子として単離されたが、実際の機能は今日まで不明なままであった。WIF-1は、その配列からも明らかなように、EGF様リピートを有していることから、本発明では、EGF様リピートは分化調節機能が注目される。別の局面では、WIF特有のドメインである、マウスWIF-1のアミノ酸配列約30位～約180位に相当するWIFドメインもまたその分化調節機能が注目される。本発明では、WIFドメインを有

するタンパク質であって、必要に応じて E G F 様リピートを有するタンパク質が、必要に応じて S C F のような生存に必須の因子の存在下で、細胞の分化をさせず、多能性を維持しつつ増殖させる機能を有することが明らかになった。従って、好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドは、 W I F ドメインと E G F 様リピートとを含む。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、 E G F 様リピートを含む他のポリペプチドであり得る。 E G F 様リピートを有するポリペプチドが造血幹細胞の多能性を喪失させずに分化を抑制するということは、これまでに報告されておらず、このことにより、臨床応用が可能な造血幹細胞の大量培養が達成されたという意味で発見は意義深い。従って、好ましい実施形態では、本発明において使用される幹細胞は、造血幹細胞であり得る。

また、 W I F - 1 の遺伝子をクローニングするために次の方法も考慮され得る。 W I F - 1 は、多種の生物において見出されていることから、生物の進化の過程で一部のアミノ酸配列が保存されていると考えられる。従って、保存されたアミノ酸配列（例えば、 W I F ドメインまたは E G F 様ドメインなど）に対応する D N A 配列を設計し、 R T - P C R （逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）のプライマーとして利用し、他の生物由来の P C R テンプレートを P C R 反応によって増幅することによって、本発明のポリペプチドに対応する他の生物の等価物が得られ得る。従って、そのような等価物もまた、本発明の範囲内にある。また、ヒトゲノムプロジェクトのようなゲノムデータ、 G e n B a n k のような遺伝子情報データベースに対して、 B L A S T のようなソフトウェアを用いて相同性検索を行つて得られた配列もまた、本発明の範囲内にある。

検索により見い出された断片をプローブとして用いて、発現臓器のような c D N A ライブラリーをスクリーニングすることにより、さら長い遺伝子配列遺伝子、または全長遺伝子をクローニングすることによって得られた配列もまた、本発明

の範囲内にある。このようなスクリーニング方法としては、放射性同位体を使用するかまたはしない方法が挙げられる。また、5' -RACE法、3' -RACE法のようなライブラリーを使用しない方法も利用可能である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含むベクターで形質転換された幹細胞が提供される。

別の局面では、本発明は、幹細胞を未分化のまま多能性を維持するための組成物を提供する。この組成物は、WIFドメインを有するポリペプチドを含む。本発明の組成物は、必要に応じて、さらに、幹細胞生存因子を含む。「幹細胞生存因子」は、上述のように幹細胞の生存に必須の因子をいう。従来、幹細胞の生存（および分化）には、SCFが必要と考えられていた。しかし、Ornitz M., et al. (Immunity, Vol. 10, 173-182, 1999) は、SCFのレセプターであるc-Kitを発現しない多能性造血幹細胞を発見した。従って、SCF自体が全ての幹細胞生存に必須であるとは限らないことが示されている。また、SCF自体には分化活性はないことが示されている。したがって、本明細書において使用される幹細胞は、それが生存する状況下であれば、WIFドメインを有するポリペプチドの存在下で、未分化のままかつ多能性を保持したまま増殖することができる。通常は、幹細胞は上述のようにSCFを必要とすることから、好ましくは、WIFドメインを有するポリペプチド（例えば、WIF-1）とSCFとの存在下で、未分化のままかつ多能性を保持したまま増殖する。従って好ましい実施形態では、上記幹細胞生存因子は、SCFである。なお、SCF単独の存在下では、本明細書において実施例で示されるように、生存を維持するものの、多能性を徐々に消失させることが明らかになった。

本発明の別の局面において、本発明は、インピトロで未分化のまま、かつ、多能性を有する、幹細胞を提供する。好ましい実施形態では、本発明の細胞は造血

幹細胞である。好ましくは、本発明の、インピトロで未分化のまま、かつ、多能性を有する、幹細胞は、少なくとも3日間または少なくとも5日間、好ましくは、少なくとも6日間、さらに好ましくは少なくとも10日間、さらに好ましくは少なくとも20日間、30日間、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年間、多能性を保持する。天然には、分化せず、かつ、多能性を保持する、幹細胞としては、新鮮な幹細胞（例えば、造血幹細胞）があるが、本発明の因子の非存在下では、すぐに分化してしまうかまたは死滅することから、上記のように長期間（例えば、数日～数年）未分化のままの状態を維持することは、従来技術では達成できなかった格別の効果といえる。生体から分離した直後の幹細胞と同じ機能を、従来では達成できなかったほど長時間保持することができるということは格別の効果といえる。本明細書において多能性保持期間とは、分化するように運命付けられるまでの期間をいう。分化したかどうかの判定は、種々の公知の方法を用いて行うことができ、そのような方法としては、例えば、コロニーアッセイによる判定がある。1つの実施形態において、コロニーアッセイによって判定される場合、本発明のインピトロで単離された幹細胞は、それは少なくとも14日間多能性を保持する。

好ましい実施形態において、本発明の細胞に備わる多能性は、血液細胞への分化能を包含する。

20 別の局面において、本発明は、長期多能性維持細胞組成物を提供する。本明細書において、「長期多能性維持細胞組成物」とは、細胞を含む組成物であって、その細胞（好ましくは幹細胞）が長期にわたって（例えば、少なくとも3日以上、好ましくは、少なくとも5日間、より好ましくは、少なくとも10日間、さらに好ましくは少なくとも20日間、30日間、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年間）、多能性を保持しながら分化しない、組成物をいう。本発明の長期多能誠意時細胞組成物は、幹細胞；およびWIFドメインを有するポリペプチドを含有する。

本発明の1つの実施形態において、上記幹細胞は、造血幹細胞であり得る。別の実施形態において、上記幹細胞は、他の組織幹細胞であり得る。他の実施形態において、上記幹細胞は胚性幹細胞であり得る。

5

好ましくは、本発明の組成物において、幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞、好ましくは、少なくとも 2×10^3 細胞、少なくとも 5×10^3 細胞、少なくとも 10^4 細胞、少なくとも 2×10^4 細胞、少なくとも 5×10^4 細胞、少なくとも 10^5 細胞、少なくとも 2×10^5 細胞、少なくとも 5×10^5 細胞、少なくとも 10^6 細胞、少なくとも 2×10^6 細胞、少なくとも 5×10^6 細胞、少なくとも 10^7 細胞、少なくとも 2×10^7 細胞、少なくとも 5×10^7 細胞、少なくとも 10^8 細胞、少なくとも 2×10^8 細胞、少なくとも 5×10^8 細胞、少なくとも 10^9 細胞、少なくとも 2×10^9 細胞、少なくとも 5×10^9 細胞、少なくとも 10^{10} 細胞、または少なくとも 10^{10} 細胞を超えて存在する。適切な量は、使用する状況に応じて変動し、当業者であれば、組成物中に存在する因子の状態、医薬に使用する場合は、患者の状態、患者の疾患の状態、投与経路、投与形態などにより応じて適宜決定することができる。

好ましい実施形態において、上記WIFドメインを有するポリペプチドは、WIF-1（例えば、配列番号2、4、6、8または10に示される配列を含む）であり得る。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、EGF様リピートを有するポリペプチドであり、そのようなポリペプチドとしては、notchファミリータンパク質のメンバー（notch-1、notch-2、jagged-1、D11-1、DLKなど）が挙げられる。本発明のポリペプチドまたは本発明において使用されるポリペプチドは、天然型のポリペプチドであってもよく、機能的に等価なものであれば、組換え産生されたポリペプチド、

合成ポリペプチドでも、改変体でもよい。本発明のポリペプチドは、幹細胞に対して核酸形態で提供され得る。その場合、その幹細胞は、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子で形質転換され得る。形質転換の方法は、当該分野において周知であり、本明細書において他の場所において詳述されている。5 従って、当業者であれば、本明細書の教示に従って、そのような形質転換を行なうことができる。

本発明の好ましい実施形態において、上記ポリペプチドは、少なくとも0. 1 ng /m1 存在する。より好ましくは、上記ポリペプチドは、1. 0 ng /m1 少なくとも2. 0 ng /m1、少なくとも5. 0 ng /m1、少なくとも5. 0 ng /m1、少なくとも5. 0 ng /m1、少なくとも20. 0 ng /m1、少なくとも50. 0 ng /m1、少なくとも100. 0 ng /m1、少なくとも200. 0 ng /m1、少なくとも500. 0 ng /m1、少なくとも1. 0 μ g /m1、少なくとも2. 0 μ g /m1、少なくとも2. 0 μ g /m1、少なくとも10. 0 μ g /m1、少なくとも100. 0 μ g /m1 または少なくとも1 mg /m1 を超えて存在し得る。10 15

好ましい実施形態において、本発明の組成物は、幹細胞生存因子をさらに含む。好ましくは、この幹細胞生存因子はSCFであり得る。未分化のまま多能性を維持する活性は、本発明のポリペプチドにこれら幹細胞生存因子を共存させることによって増強される。20

好ましい実施形態において、上記幹細胞生存因子（例えば、SCF）は、少なくとも0. 1 ng /m1 存在し得る。より好ましくは、上記幹細胞生存因子（例えば、SCF）は、1. 0 ng /m1 少なくとも2. 0 ng /m1、少なくとも5. 0 ng /m1、少なくとも5. 0 ng /m1、少なくとも5. 0 ng /m1、少なくとも

20.0 ng /m1、少なくとも50.0 ng /m1、少なくとも100.0 ng /m1、少なくとも200.0 ng /m1、少なくとも500.0 ng /m1、少なくとも1.0 μ g /m1、少なくとも2.0 μ g /m1、少なくとも10.0 μ g /m1、少なくとも2.0 μ g /m1、少なくとも100.0 μ g /m1または少なくとも1mg/m1を5
を超えて存在し得る。

別の好ましい実施形態において、幹細胞生存因子はTPOであり得る。未分化のまま多能性を維持する活性は、本発明のポリペプチドにTPOを共存させることによって増強される。TPOは、SCFおよび/またはFLに加えて添加することによって未分化のまま多能性を維持する活性を増強することができる。10

好ましい実施形態において、TPOは、1.0 ng /m1少なくとも2.0 ng /m1、少なくとも5.0 ng /m1、少なくとも5.0 ng /m1、少なくとも20.0 ng /m1、少なくとも50.0 ng /m1、少なくとも100.0 ng /m1、少なくとも200.0 ng /m1、少なくとも500.0 ng /m1、少なくとも1.0 μ g /m1、少なくとも2.0 μ g /m1、少なくとも10.0 μ g /m1、少なくとも100.0 μ g /m1または少なくとも1mg/m1を超えて存在し得る。15
20

別の好ましい実施形態において、幹細胞生存因子はf1t-3リガンド(FL)であり得る。より好ましくは、未分化のまま多能性を維持する活性は、本発明のポリペプチドに複数の幹細胞生存因子(例えば、SCF、TPOおよびFLの少なくとも2つ、好ましくは3つ)とを共存させることによってさらに増強される。25

好ましい実施形態において、FLは、少なくとも0.1 ng/m¹存在し得る。より好ましくは、FLは、1.0 ng/m¹少なくとも2.0 ng/m¹、少なくとも5.0 ng/m¹、少なくとも5.0 ng/m¹、5
少なくとも20.0 ng/m¹、少なくとも50.0 ng/m¹、少なくとも100.0 ng/m¹、少なくとも200.0 ng/m¹、少なくとも500.0 ng/m¹、少なくとも1.0 μg/m¹、少なくとも2.0 μg/m¹、少なくとも10.0 μg/m¹、少なくとも100.0 μg/m¹または少なくとも1m
10 g/m¹を超えて存在し得る。

別的好ましい実施形態において、本発明は、分化細胞を調製するための組成物が提供する。この分化細胞は、血液細胞の障害を処置するために使用され得る。分化細胞を幹細胞から調製する方法は当該分野において周知であり、例えば造血
15 因子を添加する方法などが挙げられる。

別の局面において、本発明は、幹細胞を未分化のまま、多能性を維持する方法を提供する。この方法は、1) 該幹細胞にWIFドメインを有するポリペプチドを提供する工程、を包含する。

20

本発明の幹細胞の多能性を維持する方法の実施形態において、上記組成物の好ましい実施形態における特定事項はまた、本発明の方法の特定事項であり得る。

本発明の1つの実施形態において、上記WIFドメインを有するポリペプチド
25 (例えば、WIF-1 (配列番号2、4、6、8および10に示される配列を含むポリペプチドなど))は、ポリペプチド形態で直接提供され得る。別の実施形

態において、このポリペプチドは、核酸形態で提供され得る。核酸形態で提供される場合は、本発明の方法は、上記幹細胞をそのポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子で形質転換する工程をさらに包含する。

5 本発明の別の実施形態において、本発明の方法は、幹細胞生存因子（例えば、
S C F）を上記幹細胞に提供する工程をさらに包含する。幹細胞生存因子は、W
I F ドメインを有するポリペプチドの提供前、後、または同時に提供される。こ
の幹細胞生存因子は、ポリペプチド形態で直接提供され得る。別の実施形態にお
いて、この幹細胞生存因子は、核酸形態で提供され得る。核酸形態で提供され
る場合は、本発明の方法は、上記幹細胞をその幹細胞生存因子をコードする核酸配
10 列を含む核酸分子で形質転換する工程をさらに包含する。

別の局面において、本発明は、長期多能性保持細胞組成物を生産する方法を提
供する。この方法は、1) 幹細胞を提供する工程、2) 該幹細胞にW I F ドメイ
15 ンを有するポリペプチドを提供する工程、および3) 処理された該幹細胞を収集
する工程、を包含する。

本発明の長期多能性保持細胞組成物を生産する方法の実施形態において、上記
組成物の好ましい実施形態における特定事項はまた、本発明の方法の特定事項で
20 あり得る。

本発明の1つの実施形態において、上記W I F ドメインを有するポリペプチド
(例えば、W I F - 1) は、ポリペプチド形態で直接提供され得る。別の実施形
態において、このポリペプチドは、核酸形態で提供され得る。核酸形態で提供さ
れる場合は、本発明の生産方法は、上記幹細胞をそのポリペプチドをコードする
25 核酸配列を含む核酸分子で形質転換する工程をさらに包含する。

本発明の別の実施形態において、本発明の生産方法は、幹細胞生存因子（例えば、S C F）を上記幹細胞に提供する工程をさらに包含する。幹細胞生存因子は、W I F ドメインを有するポリペプチドの提供前、後、または同時に提供される。

5 この幹細胞生存因子は、ポリペプチド形態で直接提供され得る。別の実施形態において、この幹細胞生存因子は、核酸形態で提供され得る。核酸形態で提供される場合は、本発明の生産方法は、上記幹細胞をその幹細胞生存因子をコードする核酸配列を含む核酸分子で形質転換する工程をさらに包含する。形質転換などの技術は、当該分野において周知であり、本明細書において他の箇所において説明
10 されている。

別の局面において、本発明は、分化細胞を大量生産する方法を提供する。この方法は、1) 幹細胞を提供する工程、2) 該幹細胞にW I F ドメインを有するポリペプチドを提供する工程、3) 処理された該幹細胞を収集する工程、および
15 4) 該幹細胞に分化因子を提供する工程を包含する。

本発明の分化細胞を大量生産する方法の実施形態において、上記組成物の好ましい実施形態における特定事項はまた、本発明の方法の特定事項であり得る。

20 本発明の1つの実施形態において、上記W I F ドメインを有するポリペプチド（例えば、W I F - 1）は、ポリペプチド形態で直接提供され得る。別の実施形態において、このポリペプチドは、核酸形態で提供され得る。分化因子もまた、ポリペプチド形態または核酸形態で提供され得る。核酸形態で提供される場合は、分化因子が本発明のポリペプチドよりも遅く発現するようなベクター構築物を作
25 製してその構築物で幹細胞を形質転換することもできる。そのようなベクター構築物の作製方法および形質転換する方法は、当該分野において周知であり、当業

者であれば、本願明細書の教示に従い容易に実施することができる。

本発明の別の実施形態において、本発明の生産方法は、幹細胞生存因子（例えば、SCF）を上記幹細胞に提供する工程をさらに包含する。幹細胞生存因子は、
5 WIFドメインを有するポリペプチドの提供前、後、または同時に提供される。この幹細胞生存因子は、ポリペプチド形態で直接提供され得る。別の実施形態において、この幹細胞生存因子は、核酸形態で提供され得る。核酸形態で提供される場合は、本発明の生産方法は、上記幹細胞をその幹細胞生存因子をコードする核酸配列を含む核酸分子で形質転換する工程をさらに包含する。形質転換などの
10 技術は、当該分野において周知であり、本明細書において他の箇所において説明されている。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドおよび幹細胞生存因子をコードする核酸配列は、一定期間の後に発現が低下または停止するように操作することができる。その場合、さらに、一定期間の後に分化因子を発言させ
るよう操作することもできる。

15

他の局面において、本発明は、分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置する方法を提供する。この方法は、1) 被検体に長期多能性保持細胞組成物を投与する工程であって、この長期多能性保持細胞組成物は、幹細胞；およびWIFドメインを有するポリペプチドを包含する、工程、を包含する。投与方法は、
20 当該分野において周知の任意の方法を使用し得る。投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。好ましくは、上記WIF-1ドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示される配列またはその改変体の配列を含み得、そしてヒト組換えWIF-1であり得る。

本発明の分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置する方法の実施形態において、上記組成物の好ましい実施形態における特定事項はまた、本発明の方法の特定事項であり得る。

5

他の局面において、本発明は、分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置する方法を提供する。この方法は、1) 本発明のポリペプチドで処理した幹細胞から調製された分化細胞を被検体に投与する工程、を包含する。投与方法は、当該分野において周知の任意の方法を使用し得る。投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。

15 本発明の分化細胞（例えば血液細胞）の障害に起因する疾患または障害を処置する方法の実施形態において、上記組成物の好ましい実施形態における特定事項はまた、本発明の方法の特定事項であり得る。

本発明の処置方法は、分化細胞に起因する疾患または障害に罹患し得る生物であれば、脊椎動物または無脊椎動物のどのような生物をも対象とすることができる。好ましい実施形態では、そのような生物は、脊椎動物であり、より好ましくは、そのような生物は、哺乳動物（例えば、齧歯類など）であり、さらに好ましくは霊長類であり、最も好ましくはヒトであり得る。

25 そのような製剤の処方手順は、当該分野において公知であり、例えば、日本薬局方、米国薬局方、他の国の薬局方などに記載されている。従って、当業者は、

本明細書の記載があれば、過度な実験を行うことなく、投与すべきポリペプチド量および細胞量を決定することができる。

注射剤は当該分野において周知の方法により調製することができる。例えば、

5 適切な溶剤（生理食塩水、P B S のような緩衝液、滅菌水など）に溶解した後、
フィルターなどで濾過滅菌し、次いで無菌容器（例えば、アンプルなど）に充填
することにより注射剤を調製することができる。

本発明により処置され得る疾患または障害は、本発明の幹細胞が分化し得る分化細胞の障害に関連する疾患または障害であり得る。好ましい実施形態において、
10 上記分化細胞は血液細胞であり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：貧血（例えば、再生不良性貧血（特に重症再生不良性貧血）、腎性貧血、癌性貧血、二次性貧血、不応性貧血など）、癌または腫瘍（例えば、白血病）およびその化学療法処置後の造血不全、
15 血小板減少症、急性骨髄性白血病（特に、第1寛解期（H i g h - r i s k 群のみ）、第2寛解期以降の寛解期）、急性リンパ性白血病（特に、第1寛解期、第2寛解期以降の寛解期）、慢性骨髄性白血病（特に、慢性期、移行期）、悪性リンパ腫（特に、第1寛解期（H i g h - r i s k 群）、第2寛解期以降の寛解期）、多発性骨髄腫（特に、発症後早期）、好中球減少症など。好ましい実施形態において、本発明により処置される疾患または障害は、ヒトの疾患または障害
20 であり得る。

本発明の幹細胞によって、従来の天然物由来の造血幹細胞移植治療に伴う副作用（特に、異物、異種細胞に伴うもの、例えば、感染、移植片対宿主病など）が
25 回避された。この効果は、未分化のまま多能性を維持する技術が本発明によって初めて達成されたことによって、達成されたもので、格別の効果といえる。また、

幹細胞を長期間未分化のまま多能性を維持することが可能になったことで、多能性幹細胞を大量培養することも可能になった。その上、大量培養された幹細胞から大量に分化細胞も調製することが可能になった。このような効果は、従来の技術では達成不可能であった格別の効果であるといえる。

5

別の実施形態では、本発明の処置方法は、さらに他の薬剤もまた投与する工程を包含し得る。そのような薬剤は、当該分野において公知の任意の医薬であり得、例えば、そのような薬剤は、薬学において公知の任意の薬剤（例えば、抗生物質など）であり得る。当然、そのような薬剤は、2種類以上の他の薬剤であり得る。10 そのような薬剤としては、例えば、日本薬局方最新版、米国薬局方最新版、他の国の薬局方の最新版において掲載されているものなどが挙げられる。そのような薬剤は、好ましくは、造血系に対して効果を有するものであり得る。

15 他の実施形態において、上記細胞は2種類以上の細胞を含み得る。2種類以上の細胞を使用する場合、同一もしくは類似の性質または由来の細胞を使用してもよく、異なる性質または由来の細胞を使用してもよい。

20 本発明の方法において使用される因子および細胞の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、因子の形態または種類、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

25 本発明の方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日一数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回—1ヶ月に1回）の投与が挙げ

られる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

別の局面において、本発明は、分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置するための医薬組成物を提供する。この医薬組成物は、幹細胞；W I F ドメインを有するポリペプチド；および薬学的に受容可能なキャリア、を含む。好ましくは、上記W I F - 1 ドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示される配列またはその改変体の配列を含み得、そしてヒト組換えW I F - 1 であり得る。

1つの実施形態において、この医薬組成物が対象とする疾患または障害は、上

述のとおりである。

本発明の医薬組成物の種々の実施形態において、上記組成物の好ましい実施形態における特定事項はまた、本発明の医薬組成物の特定事項であり得る。

別の局面において、本発明は、分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置するための医薬組成物を提供する。この医薬組成物は本発明のポリペプチドを用いて処理された幹細胞から調製された分化細胞；および薬学的に受容可能なキャリア、を含む。

1つの実施形態において、この医薬組成物が対象とする疾患または障害は、上述のとおりである。

本発明の医薬組成物の種々の実施形態において、上記組成物の好ましい実施形態における特定事項はまた、本発明の医薬組成物の特定事項であり得る。

25

本発明の医薬組成物に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分

野において公知の任意の物質が挙げられる。そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能な因子としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フイラー、增量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバント。代表的には、本発明の医薬組成物は、精製されたポリペプチド、フラグメント、改変体または誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

10

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0-8.5 のTris緩衝剤またはpH 4.0-5.5 の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。その溶液のpHはまた、種々のpHにおいて、本発明のポリペプチドの相対的溶解度に基づいて選択されるべきである。

20

組成物における溶媒は、水性または非水性のいずれかの性質を有し得る。さらに、そのビヒクルは、処方物の、pH、容量オスモル濃度、粘性、明澄性、色、滅菌性、安定性、等張性、崩壊速度または臭いを改変または維持するための他の処方物材料を含み得る。同様に、本発明の組成物は、有効成分の放出速度を改変または維持するため、または有効成分の吸収もしくは透過を促進するための他の処方物材料を含み得る。

本発明の組成物は、非経口的に投与され得る。あるいは、その組成物は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明における使用のための治療組成物は、発熱物質を含ない、経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能なタンパク質溶液の調製は、pH、等張性、安定性などに相当な注意を払うことを条件として、当業者の技術範囲内である。

本発明の治療処方物は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤（日本薬局方、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990などを参照のこと）と、所望の程度の純度を有する選択された組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。

受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、そして以下が挙げられる：リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤（例えば、Tween、プルロニック（pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG））。

本発明の細胞、組成物などは、調製後すぐに使用することもできるが、保存後（例えば、約4℃、約-18℃、約-70℃、液体窒素下など）で一定期間（例えば、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約2週間、約3週間、約4週間、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約1年など）にわたり保存した後に使用することもできる。

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

（実施例1：組換えWIF-1の調製）

PA-6細胞株（奥羽大学小玉博明博士より供与）をMinimum Essential Medium Alpha Medium (α-MEM)（シグマ、St. Louis, USA）に10%のfetal calf serumを添加し、5%CO₂存在下37℃でコンフルエントまで培養した。

PA-6細胞を回収し、Quick Prep mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech社、Uppsala, Sweden) を使用してmRNAを単離し、次にSuper Script II Rnase H-reverse transcriptase (Invitrogen社、Groningen, The Netherlands) を使用して単離したmRNAからcDNAを合成して縮重PCRに用いた。

NotchファミリーのEGF様リピートの保存配列から、配列番号11および12の縮重プライマーを合成し、以下の条件にて、WIF-1遺伝子の部分配列を単離した：

5 a) 反応溶液

プライマー（配列番号11および12）；各々10μM、cDNA；1, 500ng/ml、dNTPs；各々0.25mM、ポリメラーゼ；0.5U/ml（Takara Taq、宝酒造、滋賀）、緩衝液；MgCl₂；0.15mM、Tris-HCL（pH 8.3）；10mM、KCL；50mM

10 b) 反応サイクル

(i) 94°C、60秒；1サイクル
(ii) 94°C、20秒、60°C、20秒、
72°C、20秒；30サイクル
(iii) 72°C、3分；1サイクル。

15 反応産物のゲル電気泳動後に約180bpの核酸フラグメントを回収し配列を決定し、このフラグメントがWIF-1遺伝子由来のフラグメントであることを確認した。

このフラグメントをハイブリダイゼーションプローブとして使用して、Mouse Day 15 Embryo 5'-Stretch Plus cDNA Library (Clonetech, Palo Alto, California, USA) からWIF-1の全長クローンを単離した。配列は、配列番号1（核酸配列）および配列番号2（アミノ酸配列）に示す。

25 (2. 組換えWIF-1の発現および精製)

上記1. で単離したWIF-1の全長クローンを制限酵素Xba IとNhe

Iで切断し、切断した断片を、pCAGGS-6Hisベクター（熊本大学 宮崎純一博士から供与されたpCAGGSベクターに制限酵素サイトを持つ6Hisシークエンスを挿入した）（配列番号13）に連結し、このベクターをpCAGGS/mWIF-1-6Hisと命名した。

5 このpCAGGS/mWIF-1-6Hisを、リン酸カルシウム法により、COS7細胞に形質導入し、10% FCS添加DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いて5%CO₂存在下37°Cでコンフルエントまで培養した。

10 形質導入したCOS7細胞から、以下の方法で、組換えWIF-1を精製した。培養上清をニッケルカラム (His Trap, Amersham Pharmacia Biotech社) に通し、mWIF-1を結合させた。非特異的結合蛋白を除去するため、100 mMイミダゾール添加リン酸バッファーで十分異洗浄した後、300 mMイミダゾール添加リン酸バッファーでmWIF-1-6Hisを溶出させた。この溶出液は細胞毒性を持つイミダゾールを含むため、ゲルクロマトグラフィー (PD-10カラム、Amersham Pharmacia Biotech社) を用いてバッファーをPBSに置換した。得られた精製蛋白はSDS-PAGEを用いて電気泳動し銀染色後に精製の程度を確認した。

20

(実施例2：FACSを用いたCD34⁻KSL細胞の分離)

骨髄中の造血幹細胞を、CD34陰性または弱陽性、c-Kit陽性、Sca-1陽性、分化抗原 (Lin) 陰性の細胞 (CD34⁻KSL細胞) を分離することによって、純度の高い造血幹細胞が得られることが公知である (Osawa, Mら、Science, 273:242~245, 1996)。そこで、蛍光細胞分析分離装置 (FACS) を用いる以下の方法によって、CD34⁻KSL細

胞を分離した。そのスキームを図2示す。

(1. 骨髄細胞の懸濁液の調製)

約8～10週齢のB6マウスの大腿骨および脛骨を下腿から摘出した。筋肉、
5 脂肪組織などを取り除き、骨のみを分離した。長管骨の両端を切断し、ハリを接
続した注射器を用いて、その片側からPBS（リン酸緩衝化生理食塩水）を注入
し、骨の内容物（骨髄）を得た。PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）に浮遊させ、
ナイロンフィルター（70 μm）を通し、細胞塊や筋肉などの混入した組織を除
去した。ナイロンフィルターによって濾過した細胞懸濁液中の細胞数を計数し
10 （通常1匹のマウスから約4～5×10⁷個の細胞が得られる）、細胞濃度をP
BSによって1×10⁷細胞/m¹程度に調整した。約5m¹の細胞懸濁液を、
5m¹のフィコール（Lymphoprep, Nycomed社（Oslo, Norway）に重層し、室温、400×gにて20分間遠心分離し、赤血球や好
中球を除去した。遠心分離後、境界面の細胞を回収して、染色培地（SM；5%
15 ウシ胎児血清および0.05%NaN₃を含むPBS）で2回洗浄し、細胞を
計数する（通常、遠心分離前の細胞数の約半分の細胞が回収される）。

約1～10×10⁷細胞/m¹の細胞懸濁的に対して、ビオチン化lineage抗体（最終濃度として0.01～0.1 μg/m¹の抗Mac-1抗体（クローン：M1/70）、最終濃度として0.01～0.1 μg/m¹の抗Gr-1抗体（クローン：RB6-8C5）、最終濃度として0.01～0.1 μg/m¹の抗B220抗体（クローン：RA3-6B2）、最終濃度として0.01～0.1 μg/m¹の抗CD4抗体（クローン：RM4-5）、最終濃度として0.01～0.1 μg/m¹の抗CD8抗体（クローン：53-6.7）、および最終濃度として0.01～0.1 μg/m¹の抗赤血球抗体（クローン：抗赤血球抗体TER119）；全てPharMingen社；（San Diego,

U S A) を添加し、氷上で 30 分間反応させた。SMで2回洗浄し、100 μ l のSMに再浮遊させた。

このSMに再浮遊させた細胞を精製するために使用するDyna beadsを
5 以下のように前処理した：ストレプトアビシン化したDyna beads (Dyna beads M-280: Dynal社; Oslo, Norway) を5～6 ビーズ/細胞になるように添加し、マグネットスタンドを用いてSMで洗浄する。洗浄後のDyna beadsを10 ml のSMに再浮遊させた。

10 上記のSMに再浮遊させた細胞と前処理したDyna beadsを氷上で30 分間反応させた。7 ml のSMを添加した後、マグネットスタンドを用いて、SMに再浮遊させた細胞からDyna beadsと結合したLineage陽性細胞（ビオチン化lineage抗体と結合した細胞）を除去し、細胞数を算定した（通常、除去前の細胞数の約5～10 %の細胞が残る）。

15 遠心分離（4°C、400 \times g、5分間）後、細胞ペレットに対して、以下：
1) ビオチン化lineage抗体（最初に用いた量の5～10 %の量）；
2) 最終濃度として0.01～0.1 μ g/ml のフィコエリトリン（PE）標識化抗Sca-1抗体（クローン：E13-161.7）
20 3) 最終濃度として0.01～0.1 μ g/ml のアロフィコシアニン（APC）標識化抗c-Kit抗体（クローン：ACK2または2B8）
4) 最終濃度として0.001～0.1 μ g/ml のフルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識化抗CD34抗体（クローン：RAM34抗体）
を添加した。この時、（2）～（4）を同時に添加した。

25

氷上で30分間ほどインキュベーションした後、細胞を洗浄し、0.01～0.

1 mg/m¹ のストレプトアビジン-テキサスレッドを添加した。氷上で 30 分間ほどインキュベーションした後、細胞を洗浄し、SM を用いて細胞浮遊液の濃度を 5×10^5 細胞/m¹ 程度に調整した。

5 FACS Vantage (Becton Dickinson 社) を使用した。テキサスレッドを指標として lineage 抗原陰性の細胞を選択し (図 3 A) 、次に APC と PE を指標として Sca-1 と c-Kit で展開して KSL 細胞を選択し (図 3 B) 、そして FITC を指標として 10 % 未満の CD34 陰性細胞または CD34 弱陰性細胞を選択した (図 3 C) 。

10 選択した CD34⁻ KSL 細胞を、ソーティングして造血幹細胞として使用した。

(実施例 3 : ヒト造血幹細胞の調製)

15 ヒトでもマウスと原理的には同じプロトコールを用いて造血幹細胞を分離することができる。従って、ヒトでは抗 Sca-1 抗体の等価物を用いて上記と同様に造血幹細胞を分離することができる。

実施例 3 では、別の実験手法で本発明を実証した。ヒトでは NOD/SCID
20 マウス、ヒツジなどをレシピエントとした異種骨髄移植の系を用いて造血幹細胞をアッセイせざるをえない。この方法を用いて検出したヒト造血幹細胞が同種骨髄移植の系を用いてアッセイしたマウス造血幹細胞と実質的に同等であると考えられることから、本発明の実証方法に利用した。以下はヒト造血幹細胞の分離方法別法を示す。

25 1) インフォームドコンセントを得た後に、成人 (18 歳から 30 歳位まで

の男女) 骨髄細胞や出生時に得られる臍帯血をペハリンでコートした注射器に採取した。骨髄液ないし臍帯血を PBS で 3 倍希釈した。約 3.5 ml の細胞懸濁液を、約 1.5 ml のフィコール (Lymphoprep, Nycomed 社; Oslo, Norway) に重層し、室温、400 × g にて 30 分間遠心分離し、
5 赤血球や好中球を除去した。遠心分離後、境界面の細胞を回収して、SM で 2 回洗浄し、細胞数を算定した。

2) 約 $1 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞 / ml の細胞懸濁的に対して、ビオチン化 lineage 抗体 (それぞれ 0.01 ~ 0.1 μ g / ml の最終濃度として抗 CD 10 2 抗体、抗 CD 7 抗体、抗 CD 14 抗体、抗 CD 16 抗体、抗 CD 19 抗体、抗 CD 24 抗体、抗 CD 56 抗体、抗 CD 66b 抗体および抗 Glycophorin A 抗体を添加し、氷上で 30 分間反応させた。SM で 2 回洗浄し、SM に再浮遊させた。

15 3) マウスの場合と同様にマグネットビーズを用いて、lineage マーク 1 陽性の細胞を除去した。遠心後、最終濃度として 0.01 ~ 0.1 μ g / ml の FITC 標識抗ヒト CD 34 抗体 (Becton Dickinson 社)、最終濃度として 0.01 ~ 0.1 μ g / ml の PE 標識抗ヒト c-Kit 抗体、最終濃度として 0.01 ~ 0.1 μ g / ml の APC 標識抗ヒト CD 38 抗体 (Becton Dickinson 社) で染色した。また、lineage 抗体でも再度、染色した。

25 4) 氷上で 30 分間ほどインキュベーションした後、細胞を洗浄し、0.01 ~ 0.1 mg / ml のストレプトアビジン-テキサスレッドを添加した。氷上で 30 分間ほどインキュベーションした後、細胞を洗浄し、SM を用いて細胞浮遊液の濃度を 5×10^5 細胞 / ml に調整した。

FACS Vantage (Becton Dickinson社) を使用した。lineage抗原陰性かつCD38陰性分画を選択し、CD34とc-Kitで展開した。ヒト造血幹細胞は主にCD34+Kit+分画に濃縮されているが、マウスと同様にCD34一分画にも存在するが、最近明らかとなってきた。そこで、CD34+CD38-KL細胞とCD34-CD38-KL細胞の2種類を対象としてソーティングを行った。

(実施例4：造血幹細胞の増殖および分化に対するWIF-1の効果)

造血幹細胞の増殖および分化に対する各種タンパク質の効果を調べるために、造血幹細胞としてCD34-KSL細胞を使用し、その増殖（細胞分裂能を指標とする）および分化（成熟血球からなるコロニーの形成能を指標とする）を調べた。

(1. 単一CD34-KSL細胞の分裂能およびコロニー形成能の測定方法)

丸底96ウェルプレート (Corning Inc., New York, USA) を、培養に使用した。 5×10^{-5} Mの2-β-メルカプトエタノールおよび2mMのL-グルタミンを含むStem-Pro-34 SFM (Life Technologies) 200 μ lをウェルに添加した。補充した可溶性因子は、1.0ng/ml WIF-1 (実施例1において調製)、100ng/ml マウスSCF、100ng/ml ヒトTPO、10ng/ml マウスIL-3、100ng/ml ヒトIL-6 (PeproTech, London, England)、100ng/ml ヒトIL-11 (PeproTech, London, England)、および10ng/ml ヒトGCS-F。SCF、TPO、IL-3、およびG-CSFは、キリンピール株式会社（高崎市）製品を使用した。細胞を、加湿した5%CO₂環境下で、3

7 °Cで培養した。ウェルあたりの細胞数を培養7日目までモニターし、コロニー形成は培養14日目に判定した。

種々の所定のタンパク質存在下において、14日間単一細胞培養を行ない、少なくとも1回の細胞分裂を行なった細胞を細胞分裂陽性細胞とし、50個以上の細胞から構成されるコロニー形成を行なった細胞を、コロニー形成陽性細胞とした。

(2. 組換えWIF-1タンパク質単独でのCD34-KSL細胞の分裂およびコロニー形成に対する効果)

WIF-1が単独でCD34-KSL細胞の分裂および/またはコロニー形成を誘導するのか検討した。

SCFは、CD34-KSL細胞のある程度の分裂を誘導するが、そのコロニー形成を誘導しないことが公知である（Emaら、J. Exp. Med. v 192, Number 9, November 6, 2000）、比較対象としてSCFを用いた。

上記1. の方法に従って、種々のタンパク質を添加し、単一CD34-KSL細胞の分裂能およびコロニー形成能に対するSCFおよびWIF-1の影響を調べた。その結果を表1に示す。

表1: CD34⁻KSL細胞の分裂能およびコロニー形成能に対するWIF-1の効果

| 因子 | 細胞分裂 | コロニー形成 |
|-----------|---------------|--------|
| なし | 0/96 | 0/96 |
| SCF | 10/96(10. 4%) | 0/96 |
| WIF-1 | 0/96 | 0/96 |
| SCF+WIF-1 | 23/96(24. 0%) | 0/96 |

SCF: Stem cell factor (幹細胞因子)

表1に示されるように、WIF-1単独では、1個のCD34⁻KSL細胞が
5 2個以上なることも、コロニーを形成することもなかった。SCFとの相乗作用
により、2個以上の細胞の割合（細胞分裂の割合）が有意に増加した。しかし、
SCF+WIF-1の存在下でもコロニーを形成するまでには至らなかった。

10 (2. 他のタンパク質と組み合わせた場合の、WIF-1タンパク質によるCD34⁻KSL細胞の分裂および二次コロニー形成に対する効果)

SCFおよびFLと組み合わせた場合の、WIF-1タンパク質によるCD34⁻KSL細胞の分裂に対する効果と培養14日後に分裂した細胞中にコロニー形成細胞が残存するかどうかを検討した。コロニー形成細胞の生存を認めた場合に二次コロニー陽性と判定した。その結果を表2に示す。

表2 SCFおよび／またはFLと組み合わせたWIF-1による、CD34-KSL細胞の分裂および二次コロニー形成に対する効果

| 因子 | 細胞分裂 | 二次コロニー形成 |
|--------------|--------------|----------|
| SCF | 5/48(10.4%) | 0/5 |
| SCF+WIF-1 | 8/48(16.7%) | 5/7 |
| SCF+FL | 11/48(22.9%) | 8/9 |
| SCF+WIF-1+FL | 22/48(45.8%) | 8/8 |

SCF : Stem cell factor (幹細胞因子), FL : F5
1t-3 リガンド

表2の結果は、SCFと組み合わせた場合、WIF-1は造血幹細胞であるCD34-KSL細胞の分裂を支持し、分裂した細胞中にはコロニー形成能を有する未熟な細胞が14日以上経ても生存していることを示す。従って、WIF-1は、SCFと組み合わせて使用した場合、造血幹細胞の軽度の増殖を誘導するが、軽度に分裂した細胞は確かに生存細胞を含み、生存細胞はほとんど分化誘導をうけていないことが明らかとなった。さらに、WIF-1は、SCF+FLと組み合わせて使用した場合、未熟な細胞の生存をより支持することが明らかとなった。

(実施例5：生体内で再構築することのできる造血幹細胞の維持に対するWIF-1の効果)

単離された造血幹細胞を生体内に移植した場合に、その増殖能および分化能によって造血系が再生される。そこで、単離された造血幹細胞としてCD34-KSL細胞を培養細胞し、培養後にも培養細胞中に生体の造血を再生する能力があるかどうか、すなわち培養後にも造血幹細胞が維持されているかどうかを検討し

た。この培養液中にW I F - 1 を添加し、W I F - 1 の造血幹細胞維持に対する直接作用を検討した。

造血幹細胞の増殖能および分化能を比較定量するために、以下に示す競合的骨
5 髓再構築法を用いた。

(1. 競合的骨髓再構築法 (Competitive repopulating assay))

造血幹細胞を致死量の放射線照射したマウスに移植すると、造血幹細胞が持つ
10 自己複製能と多分可能によって長期にわたってレシピエントマウス造血系が再構
築される。逆に、この長期造血系再建能を調べることによって、移植された細胞
中の造血幹細胞の有無を判定できる。競合的骨髓再構築法 (Competitive
15 repopulating assay) とは調べたい細胞 (テスト細胞) とある一定量の骨髓細胞 (コンペティター細胞) を同時に放射線照射したマ
ウスに移植する方法である。この方法によってレシピエントマウスの短期間の生
20 存に必要な前駆細胞や長期生存に必要な造血幹細胞がテスト細胞中に存在しなく
てもレシピエントマウスの生存が可能である。また、テスト細胞中の造血幹細胞
活性を相対的に評価することもできる。具体的には、以下のとおりに実験を行な
った。

20

Ly 5 コンジェニックマウスを利用した競合的骨髓再構築法 (D. A. Ogd
en および H. S. Mickleem, (1976) Transplantati
on. 22: 287~293; ならびに D. E. Harrisonら, (197
8) J. Exp. Med. 147: 1526~1531) を行なって、調製した
25 造血幹細胞について評価した (H. Emaら, (2000) Blood. 95:
2284~2288)。手短には、培養中の CD34⁺ KSL 細胞または CD3

4⁻ K S L 細胞由来の複数の細胞 (B 6 - L y 5. 1) を 2×10^5 個の骨髓コンペティター細胞 (B 6 - F 1) と混合し、所定の期間培養し、10 個の CD 3 4⁻ K S L 細胞を含む $200 \mu l$ の細胞浮遊液を 9. 5 G y の線量で照射された B 6 - L y 5. 2 マウスに尾静脈から注射した (図 5)。

5

移植後、所定の期間マウスを Specific pathogen-free (SPF) の環境で飼育した後、マウスをエーテル吸入によって麻酔し、 $100 \mu l$ のキャピラリーチューブ (予め、0. 1 M EDTA · Na₂ / H₂O を、毛管現象を使って少量採取している) がいっぱいになるまで、眼窩静脈より採血 10 した。採取した血液をエッペンドルフチューブに移して、よく攪拌し、2, 00 0 r p m で数秒間遠心して血液を落とした。 $350 \mu l$ の蒸留水を添加した後、30 秒間室温に放置した。2 倍濃度の PBS を $350 \mu l$ 添加し、よく攪拌した後、2, 000 r p m で 2 分間遠心分離した。溶血した赤血球を含む上清を捨て、血球のペレットを SM に再浮遊し、2 等分して、遠心した。

15

細胞ペレットに対して 2 種類の抗体染色、ビオチン化抗 L y 5. 1 (A 2 0) 抗体、および F I T C 結合化 L y 5. 2 (1 0 4) 抗体を用いて実施例 1 に記載のように染色した。細胞を同時に、P E 結合体化 B 2 2 0 抗体、または P E 結合体化抗 M a c - 1 抗体および P E 結合体化抗 G r - 1 抗体、または P E 結合体化 20 抗 C D 4 抗体および P E 結合体化抗 C D 8 抗体を用いて、実施例 1 に記載のように染色した。ビオチン化抗体を、ストレプトアビジン - A P C (Pharmingen, San Diego, USA) を用いて発色させた。4 °C で 20 分間のインキュベーションの後、細胞を洗浄し、 $200 \mu l$ の SM に再浮遊して F A C S による解析を行なった。L y 5. 1 と L y 5. 2 で展開しテスト細胞由来 25 およびコンペティター細胞由来細胞さらにレシピエントの残存細胞を区別して検出した。一方では、テスト細胞由来の細胞が顆粒球・マクロファージ系、B 細胞

系およびT細胞系の細胞によって構築されているかどうかを調べた。

%キメリズムは、以下の式：

5 総キメリズム (%) = %Ly5.1細胞 × 100 / (Ly5.1細胞 + %F1
細胞)

を用いて計算した。

10 この計算式において、陽性マウスとは、顆粒球・マクロファージ系、Tリンパ球系、およびBリンパ球系の全の血球系において1%以上のキメリズムを示すマウスであり、陰性マウスとはそれ未満のマウスと定義した。

(2. WIF-1による造血幹細胞の維持に対する効果)

15 SCFおよびWIF-1を使用して、上記1.に記載の方法を用いて、造血幹細胞の維持を調べた。結果を表3に示す。

表3 WIF-1による、造血幹細胞の維持

| 因子 | 培養期間 | 移植後の日数 | 陽性マウスの数 | %キメリズム(匹数) |
|-----------|------|--------|---------|----------------|
| 1回目 | | | | |
| なし | 0日 | 12週間 | 3/3 | 10. 1±7. 2(3) |
| SCF | 5日 | 12週間 | 0/2 | ND |
| SCF+WIF-1 | 5日 | 12週間 | 8/10 | 34. 3±17. 7(8) |
| 2回目 | | | | |
| なし | 0日 | 12週間 | 7/10 | 24. 3±16. 8(7) |
| SCF | 5日 | 12週間 | 0/10 | ND |
| SCF+WIF-1 | 5日 | 12週間 | 4/10 | 15. 8±15. 3(4) |

ND : 検出不可能

5 表3に示されるように、SCFと組み合わせたWIF-1は、SCFを単独で使用した場合には見られなかった、造血幹細胞の培養期間中の維持をもたらした。

次に、SCFと組み合わせたTPO (SCF+TPO) と、WIF-1にSCFとTPOとを組み合わせた場合を比較した (SCF+TPO+WIF-1)。

10

さらに、表4に示すように、WIF-1を添加せず、SCFとTPOとを組み合わせて、CD34⁺KSL細胞培養時に添加した場合、再現性のよい造血幹細胞の維持は見られなかったが、それに対して、WIF-1にSCFとTPOとを

組み合わせた場合は、再現性よく、かつ高い割合で、造血幹細胞の維持が見られた。

表4 WIF-1による、造血幹細胞の維持

5

| 因子 | 培養期間 | 移植後の日数 | 陽性マウスの数 | %キメラ(匹数) |
|-------------------|------|--------|---------|-----------------|
| 1回目 | | | | |
| なし | 0日 | 24週間 | 6/10 | 5. 6±5. 2(6) |
| SCF+TPO | 3日 | 24週間 | 3/10 | 7. 0±6. 1(3) |
| SCF+TPO +WIF-1 | 3日 | 24週間 | 6/10 | 14. 8±11. 6(6) |
| 2回目 | | | | |
| なし | 0日 | 12週間 | 3/3 | 10. 1±7. 2(3) |
| SCF+TPO | 6日 | 12週間 | 0/10 | ND |
| SCF+TPO +WIF-1 | 6日 | 12週間 | 10/10 | 15. 0±15. 0(10) |

ND : 検出不可能

(実施例6: WIF-1存在下における幹細胞への遺伝子導入)

マウス骨髄細胞より CD34⁻KSL細胞を分離後、300から600個のCD34⁻KSL細胞に対してGFP (緑色蛍光タンパク質; Green Fluorescent Protein) をマーカー遺伝子としてWIF-1存在下あるいは非存在下に導入後、放射線照射した5匹のマウスに移植した。

レトロウイルスの準備：293T細胞株とPackaging Cell LineであるPG13、293GPおよび293GPg細胞株は10%FCSを添加したDMEMを用いた培養した。pGCsapEGFP（レトロウイルスベクターで筑波大学小野寺雅史博士より供与）をリン酸カルシウム法により293GP細胞株にトランスフェクションした。ウイルス粒子を含む培養上清を回収し、PG13細胞株に感染させた。さらに、このPG13細胞株の培養上清を用いて293GPg細胞株（テトラサイクリン感受性発現誘導システム：tet off）に感染した。Tet offにして得られた培養上清を6,000gで16時間遠心し、Stem-Pro34無血清培養液にウイルス粒子を再浮遊させた。

レンチウイルスの準備：pCS-CG-PRE（GFPの下流にwoodchuck posttranscriptional regulatory elementを挿入したSINベクター）、pMDLg/pPRE（packaging construct）、pRSV-Rev（Rev-expressing construct）、pMD.G（VSV-G-expressing construct）はすべて筑波大学三好浩之博士から供与された。これらのプラスミドを同時に293T細胞株にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションした。培養上清を回収し、超遠心にて得たウイルス粒子濃縮液を感染実験に用いた。

100 ng/ml SCFと100 ng/ml TPO存在下にD34-KSL細胞をVitronectin（宝酒造）コートした96-well plate内で無血清培養した（コントロール）。また、同じ条件下に1 ng/ml WIF-1を追加して培養した（pre-incubation）。レトロウイルス粒子濃縮液を5 μg/mlのprotamine sulfate

(Sigma, St. Louis, USA) とともに培養 24 時間後に添加した。培養 48 時間後に放射線照射したマウスに培養細胞を移植した（競合的造血系再構築法）。

5 100 ng/ml SCF、100 ng/ml FL 存在下に D 34-K SL 細胞を無血清培養した（コントロール）。また、同じ条件で 1 ng/ml WIF-1 を添加して培養した。レンチウイルス粒子濃縮液は培養開始時点に添加した。培養 24 時間以内に培養細胞を放射線照射したマウスに移植した（競合的造血系再構築法）。

10

移植後 3 月以降の培養細胞による再構築と再構築された血液細胞への遺伝子導入効率を評価した。その結果、ウイルス感染時に WIF-1 を添加したグループで有意に遺伝子導入率が高いことが明らかとなった。

15 (実施例 7：マウス WIF-1 およびヒト WIF 組換えタンパク質の大量生産)

生体内における WIF-1 の作用を調べるために大量の精製タンパク質を調製する必要がある。従って、マウスおよびヒト WIF-1 の組換えタンパク質を安定して産生する細胞株を樹立した。pcDNA3.1 発現ベクター (Invitrogen 社、Groningen, The Netherlands) にマウスまたはヒト cDNA を組み込んだ (pcDNA3.1/mWIF-1, pcDNA3.1/hWIF-1)。pcDNA3.1/mWIF-1, pcDNA3.1/hWIF-1 を、リン酸カルシウム法により、CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞株に形質導入し、10% FCS 添加 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いて 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

引き続きゼオシン (Invitrogen社、Groningen, The Netherlands) 存在下で培養することにより薬剤耐性細胞を得た。さらにFACSを用いて単細胞をソーティングした。これによって細胞株はクローン化された。次にWestern blot法を用いてWIF 5 組換えタンパク質を高発現しているクローンを選択した。

高発現しているクローンを10% FCS添加DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いて5%CO₂存在下37℃で培養することによりマウスWIF-1およびヒトWIF組換えタン 10 パク質の大量生産を行った。

(実施例8: WIF-1の保存的置換改変体の効果)

配列番号2に示す配列において、アミノ酸番号55位のイソロイシンをロイシン、109位のロイシンをイソロイシン、244位のアラニンをバリン、271位のグルタミン酸をアスパラギン酸に置き換えた改変体を部位特異的変異誘発法により作製した (配列番号15、17、19および21)。部位特異的変異誘発には、Quick ChangeTM kit (Stratagene) を製造業者の指示書に従って利用した。概説すると、以下のとおりである。

20 1. 二本鎖プラスミドDNAを熱変性させ、変異を導入した2種のプライマーを、それぞれ相補的DNA鎖の同じ塩基配列部位にアニールさせる。

25 2. PfuTurbo DNA Polymeraseを用いて、温度サイクリング法 (サイクリング数: 10~16回) によりプライマーの伸長を行うと、変異を含むニックの入った環状のDNA鎖が合成される。

3. Dpn Iにより、テンプレートDNAを分解する。dam methy laseが欠損していないE. coli株から調製したDNAはメチル化されているので、メチル化およびヘミメチル化DNAに特異的なDpn I (5' -^G_{m⁶}ATC-3')により分解される。一方、変異が導入されたDNAは分解されない。

4. ニックの入った変異を含むDNAでE. coliを形質転換する。変異を含むプラスミド中のニックは、E. coli中で修復される。

10 この手法により上記の4種の改変体（ヌクレオチドは配列番号14、16、18および20に示す）を作製し、以下の実験に用いた。

（造血幹細胞に対するWIF-1改変体の効果）

実施例4および5に記載のように実験を行って、造血幹細胞の増殖および分化、
15 ならびに生体内に移植された造血幹細胞の維持に対する効果を確認した。

野生型配列同様、SCFと組み合わせた場合、WIF-1改変体は造血幹細胞であるCD34⁺KSL細胞の分裂とコロニー形成の両方を誘導することを示した。従って、WIF-1改変体は、SCFと組み合わせて使用した場合、造血幹細胞の増殖および分化の両方を誘導したことが実証された。さらに、WIF-1改変体は、SCFと組み合わせて使用した場合、造血幹細胞の増殖と分化の両方を誘導する他の因子であるFLの効果をさらに増強したことが実証された。

SCFと組み合わせたWIF-1改変体は、SCFを単独で使用した場合には見られなかった、移植された造血幹細胞の維持をもたらした。

上記4種の改変体であってもSCFとTPOとを組み合わせた場合は、再現性よく、かつ高い割合で、造血幹細胞の維持が見られた。

従って、保存的置換改変体は、野生型配列同様に本発明の効果を持つことが実

5 証された。

(実施例9：ドメインの重要性)

次に、WIFドメインを残し、他の領域を欠如させた改変体、およびEGF様リピートを残し他の領域を欠如させた改変体を作製した。具体的には、配列番号10 2の最初のアミノ酸番号1位～176位に6His-tagを付加した改変体(ヌクレオチド配列を配列番号22に示し、アミノ酸配列を配列番号23に示す)、およびシグナルシークエンス(アミノ酸番号1位～24位)とEGF様リピート(アミノ酸番号177位から379位)とを融合し6His-tagを付加した改変体(ヌクレオチド配列を配列番号24に示し、アミノ酸配列を配列番号25に示す)を該当分野において周知の方法で作製した。

(造血幹細胞に対するドメインの重要性)

実施例4および5に記載のように実験を行って、造血幹細胞の増殖および分化、ならびに生体内に移植された造血幹細胞の維持に対する効果を確認した。

20

野生型配列同様、SCFと組み合わせた場合、これらのWIF-1改変体は造血幹細胞であるCD34⁺KSL細胞の分裂とコロニー形成の両方を誘導することを示した。従って、これらのWIF-1改変体は、SCFと組み合わせて使用した場合、造血幹細胞の増殖と分化の両方を誘導した。さらに、WIF-1改変体は、SCFと組み合わせて使用した場合、造血幹細胞の増殖および分化の両方を誘導する他の因子であるFLの効果をさらに増強していた。

S C F と組み合わせた W I F - 1 改変体は、 S C F を単独で使用した場合には見られなかった、移植された造血幹細胞の維持をもたらした。

5 上記改変体であっても S C F と T P O とを組み合わせた場合は、再現性よく、かつ高い割合で、造血幹細胞の維持が見られた。

ただし、 W I F ドメインのみを有する改変体、 E G F 様リピートのみを有する改変体は、それぞれ、野生型配列よりも効果がわずかに減少していた。従って、
10 両方のドメインを有することが本発明の実施においてより好ましいことが分かる。

従って、 W I F ドメインのみを有する改変体、 E G F 様リピートのみを有する改変体は、野生型配列同様に本発明の効果を持つことが実証された。

15 産業上の利用可能性

本発明により、幹細胞を未分化のまま多能性を維持することが達成された。このことにより、簡便に、大量の幹細胞（例えば、造血幹細胞）を提供することが可能となった。加えて、本発明の幹細胞組成物は、均質で不純物もかなり減らす
20 ことができることから、従来の造血幹細胞治療で問題となっていた副作用（例えば、感染、拒絶反応）などを顕著に改善することができた。また、有効な遺伝子治療に利用できることが示された。これらのこととは、格別の効果といえる。また、本発明の処置方法のために使用する組成物、細胞、キット、医薬などを製造することには、産業上の利用可能性が十分ある。本発明は、医師以外に、例えば、製
25 薬企業などが業として本発明の組成物などを生産することができることから、産業上の利用可能性または有用性は十分にあると考えられる。本発明の方法もまた、

純粹な医療目的の治療方法に加え、事業目的の治験そのものとして有用であることから、産業上の利用可能性がある。また、本発明の治療方法を間接的または直接的に実施することが、医療業周辺の産業において利用する可能性が十分考えられることから、産業上の利用可能性または有用性は十分にある。

請 求 の 範 囲

1. 幹細胞を分化させずにその多能性を維持する、W I F ドメインを有するポリペプチド。

5

2. 前記W I F ドメインは、配列番号4に記載の配列の約30位～約180位のうちの少なくとも5アミノ酸を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

10 3. 前記W I F ドメインは、配列番号4に記載の配列の約30位～約180位を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

4. 前記ポリペプチドは、EGF様リピートをさらに含む、請求項1に記載のポリペプチド。

15 5. 前記EGF様リピートは、CX3CX5CX5CXCX8CX4からなる少なくとも1つのリピートを含み、ここで、Cはシステインであり、Xは任意のアミノ酸を表す、請求項4に記載のポリペプチド。

20 6. 前記ポリペプチドは、配列番号4に示される配列を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

7. 前記幹細胞は、造血幹細胞である、請求項1に記載のポリペプチド。

25 8. 幹細胞を分化させずに多能性を維持するための組成物であつて、該組成物は、W I F ドメインを有するポリペプチドを含む、組成物。

9. 前記ポリペプチドは、EGF様リピートをさらに有する、請求項8に記載の組成物。

10. 前記ポリペプチドは、配列番号4に示される配列を有する、請求項8に記載の組成物。

11. さらに、幹細胞生存因子を含む、請求項8に記載の組成物。

12. 前記幹細胞生存因子はSCFである、請求項8に記載の組成物。

10

13. インビトロで分化せず、かつ、多能性を保持する、幹細胞。

14. 造血幹細胞である、請求項13に記載の幹細胞。

15. 15. 前記多能性を保持する期間は、少なくとも6日間である、請求項13に記載の幹細胞。

16. 前記多能性は、血液細胞への分化能を包含する、請求項13に記載の幹細胞。

20

17. 長期多能性保持細胞組成物であって、幹細胞；およびWIFドメインを有するポリペプチド、を包含する、長期多能性保持細胞組成物。

18. 前記ポリペプチドは、EGF様リピートをさらに含む、請求項17に記載の長期多能性保持細胞組成物。

19. 前記幹細胞は、造血幹細胞である、請求項 17 に記載の長期多能性維持細胞組成物。

20. 前記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、請求項 17 に記載の長期
5 多能性保持細胞組成物。

21. 前記WIF ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に記載の配列を含む、請求項 17 に記載の長期多能性保持細胞組成物。

10 22. 前記WIF ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも 0.1 ng/
mL 存在する、請求項 17 に記載の長期多能性保持細胞組成物。

23. さらに、幹細胞生存因子を含む、請求項 17 に記載の長期多能性保持細胞組成物。

15

24. 前記幹細胞生存因子は SCF である、請求項 23 に記載の長期多能性保持細胞組成物。

25. 前記幹細胞生存因子は FLT-3 リガンドである、請求項 23 に記載の
20 長期多能性保持細胞組成物。

26. 前記幹細胞生存因子は、少なくとも 1 ng/mL 存在する、請求項 23 に記載の組成物。

25 27. 分化細胞を調製するための、請求項 23 に記載の組成物であって、該分化細胞は、血液細胞の障害を処置するために使用される、組成物。

28. 幹細胞を分化させずに、多能性を維持させる方法であって、

1) 該幹細胞にWIFドメインを有するポリペプチドを提供する工程、
を包含する、方法。

5

29. 前記ポリペプチドは、EGF様ドメインをさらに含む、請求項27に記載
の方法。

30. 前記幹細胞は、造血幹細胞である、請求項27に記載の方法。

10

31. 前記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、請求項27に記載の方法。

32. 前記WIFドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示す配列を含
む、請求項27に記載の方法。

15

33. 前記WIFドメインを有するポリペプチドは、少なくとも0.1 ng/
mL存在する、請求項27に記載の方法。

34. さらに、

20 2) 幹細胞生存因子を前記幹細胞に提供する工程、
を包含する、請求項27に記載の方法。

35. 前記幹細胞生存因子はSCFである、請求項34に記載の方法。

25 36. 前記幹細胞生存因子はFLT-3リガンドである、請求項34に記載の
方法。

37. 前記幹細胞生存因子は、少なくとも $1 \text{ ng}/\text{mL}$ 存在する、請求項 34 に記載の方法。

5 38. 長期多能性保持細胞組成物を生産する方法であって、

- 1) 幹細胞を提供する工程、
- 2) 該幹細胞に WIF ドメインを有するポリペプチドを提供する工程、および
- 3) 処理された該幹細胞を収集する工程、

を包含する、方法。

10

39. 前記 WIF ドメインを有するポリペプチドは、EGF 様リピートをさらに含む、請求項 38 に記載の方法。

40. 前記幹細胞は、造血幹細胞である、請求項 38 に記載の方法。

15

41. 前記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、請求項 38 に記載の方法。

42. 前記 WIF ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に示される配列を含む、請求項 38 に記載の方法。

20

43. 前記 WIF ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも $0.1 \text{ ng}/\text{mL}$ 存在する、請求項 38 に記載の方法。

44. さらに、

25 2) 幹細胞生存因子を前記幹細胞に提供する工程、
を包含する、請求項 38 に記載の方法。

4 5. 前記幹細胞生存因子は S C F である、請求項 4 4 に記載の方法。

4 6. 前記幹細胞生存因子は f 1 t - 3 リガンドである、請求項 4 4 に記載の
5 方法。

4 7. 前記幹細胞生存因子は、少なくとも 1 n g / m l 存在する、請求項 4 4 に
記載の方法。

10 4 8. 分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置する方法であって、
1) 被検体に長期多能性保持細胞組成物を投与する工程であって、該長期多能
性保持細胞組成物は、
幹細胞；および
W I F ドメインを有するポリペプチドを包含する、工程、
15 を包含する、方法。

4 9. 前記W I F ドメインを有するポリペプチドは、E G F 様リピートをさらに
含む、請求項 4 8 に記載の方法。

20 5 0. 前記分化細胞は血液細胞である、請求項 4 8 に記載の方法。

5 1. 前記幹細胞は、造血幹細胞である、請求項 4 8 に記載の方法。

5 2. 前記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、請求項 4 8 に記載の方法。

25 5 3. 前記W I F ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に示される配列

を含む、請求項4 9に記載の方法。

5 4. 前記W I F ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも0. 1 n g / m¹ 存在する、請求項4 9に記載の方法。

5

5 5. 前記長期多能性保持細胞組成物は、幹細胞生存因子をさらに含む、請求項4 9に記載の方法。

5 6. 前記幹細胞生存因子はS C F である、請求項5 5に記載の方法。

10

5 7. 前記幹細胞生存因子はf 1 t - 3 リガンドである、請求項5 5に記載の方法。

15

5 8. 前記幹細胞生存因子は、少なくとも1 n g / m¹ 存在する、請求項5 5に記載の方法。

20

5 9. 前記幹細胞を分化させる工程をさらに包含する、請求項4 9に記載の方法。

6 0. 前記被検体は、ヒトである、請求項4 9に記載の方法。

6 1. 前記W I F - 1 ドメインを有するポリペプチドは、配列番号4に示される配列またはその改変体の配列を含むヒト組換えW I F - 1 である、請求項4 9に記載の方法。

25 6 2. 分化細胞の障害に起因する疾患または障害を処置するための医薬組成物であつて、

幹細胞；
W I F ドメインを有するポリペプチド；および
薬学的に受容可能なキャリア、
を含む、医薬組成物。

5

6 3. 前記ポリペプチドは、 E G F 様リピートをさらに含む、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

6 4. 前記分化細胞は血液細胞である、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

10

6 5. 前記幹細胞は、造血幹細胞である、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

6 6. 前記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

15

6 7. 前記W I F ドメインを有するポリペプチドは、W I F - 1 である、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

6 8. 前記W I F ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも 0. 1 n g /
20 m l 存在する、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

6 9. 幹細胞生存因子をさらに含む、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

7 0. 前記幹細胞生存因子は S C F である、請求項 6 9 に記載の医薬組成物。

25

7 1. 前記幹細胞生存因子は f 1 t - 3 リガンドである、請求項 6 9 に記載の

医薬組成物。

72. 前記幹細胞生存因子は、少なくとも $1\text{ ng}/\text{mL}$ 存在する、請求項 6 9 に記載の医薬組成物。

5

73. 前記疾患または障害がヒトの疾患または障害である、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

74. 前記WIF-1 ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に示される配列またはその改変体の配列を含むヒト組換えWIF-1 である、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

75. 幹細胞を分化させずに、多能性を維持させるための、WIF ドメインを有するポリペプチドの使用。

15

76. 前記ポリペプチドは、EGF 様リピートをさらに含む、請求項 7 5 に記載の使用。

77. 前記幹細胞は、造血幹細胞である、請求項 7 5 に記載の使用。

20

78. 前記幹細胞は、少なくとも 10^3 細胞存在する、請求項 7 5 に記載の使用。

79. 前記WIF ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に示される配列を含む、請求項 7 5 に記載の使用。

25

80. 前記WIF ドメインを有するポリペプチドは、少なくとも $0.1\text{ ng}/$

m 1 存在する、請求項 7 5 に記載の使用。

8 1. 幹細胞生存因子と組み合わせた、請求項 7 5 に記載の使用。

5 8 2. 前記幹細胞生存因子は S C F である、請求項 8 1 に記載の使用。

8 2. 前記幹細胞生存因子は f 1 t - 3 リガンドである、請求項 8 1 に記載の使用。

10 8 3. 前記幹細胞生存因子は、少なくとも 1 n g / m 1 存在する、請求項 8 1 に記載の使用。

8 4. 前記疾患または障害は、ヒトの疾患または障害である、請求項 7 5 に記載の使用。

15

8 5. 前記 W I F - 1 ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 4 に示される配列またはその改変体の配列を含むヒト組換え W I F - 1 である、請求項 7 5 に記載の使用。

1A

図 1B

| | | | |
|--------|-----|--|-----|
| hWIF-1 | 178 | QAECPGGCRNGFCNERRVCECPDGFCYGPHECEKALCIPRCMNGGLCVTPGFCICPPGFY | 237 |
| hWIF-1 | 178 | IQAECPPGGCRNGFCNERRVCECPDGFCYGPHECEKALCIPRCMNGGLCVTPGFCICPPGFY | 237 |
| rWIF-1 | 178 | QAECPGGCRNGFCNERRVCECPDGFCYGPHECEKALCIPRCMNGGLCVTPGFCICPPGFY | 237 |
| xWIF-1 | 173 | QAECPGGCRNGFCNERRVCECPDGFCYGPHECEKALCIPRCMNGGLCVTPGFCICPPGFY | 232 |
| zWIF-1 | 176 | QAECPGGCRNGFCNERRVCECPDGFCYGPHECEKALCIPRCMNGGLCVTPGFCICPPGFY | 235 |
| hWIF-1 | 238 | GVNCDKANCSITCFCNGGTCFVYPGKCTICPPGLEGEQCELSKCPQPCRNGGKCTIGSKCKQ | 297 |
| hWIF-1 | 238 | GVNCDKANCSITCFCNGGTCFVYPGKCTICPPGLEGEQCELSKCPQPCRNGGKCTIGSKCKQ | 297 |
| rWIF-1 | 238 | GVNCDKANCSITCFCNGGTCFVYPGKCTICPPGLEGEQCELSKCPQPCRNGGKCTIGSKCKQ | 295 |
| xWIF-1 | 233 | GVNCDKANCSITCFCNGGTCFVYPGKCTICPPGLEGEQCELSKCPQPCRNGGKCTIGSKCKQ | 292 |
| zWIF-1 | 236 | GVNCDKANCSITCFCNGGTCFVYPGKCTICPPGLEGEQCELSKCPQPCRNGGKCTIGSKCKQ | 295 |
| hWIF-1 | 298 | KGYQGDIKSKPVCPEPGCAHGTCHEPNKOCCREGMHRHCKNKRKYGASIMHAPRPGAGIE | 357 |
| hWIF-1 | 298 | KGYQGDIKSKPVCPEPGCAHGTCHEPNKOCCREGMHRHCKNKRKYGASIMHAPRPGAGIE | 357 |
| rWIF-1 | 296 | - - - - - CEPGCGCAHGTCHEPNKOCCREGMHRHCKNKRKYGASIMHAPRPGAGIE | 343 |
| xWIF-1 | 293 | - - - - - CEPNKOCCREGMHRHCKNKRKYGASIMHAPRPGAGIE | 352 |
| zWIF-1 | 296 | KGYQGDIKSKPVCPEGAHGTCHEPNKOCCREGMHRHCKNKRKYGASIMHAPRPGAGIE | 355 |
| hWIF-1 | 358 | RHTPSLKKAFEDRDPPEQ-NYTW | 379 |
| hWIF-1 | 358 | QHTPSLKKAFEDRDPPEQ-NYTW | 379 |
| rWIF-1 | 344 | RHTPSLKKAFEDRDPPEQ-NYTW | 365 |
| xWIF-1 | 353 | QHTPSLKKAFEDRDPPEQ-NYTW | 374 |
| zWIF-1 | 356 | SPSVAAMEAPETSQESITNYV | 378 |

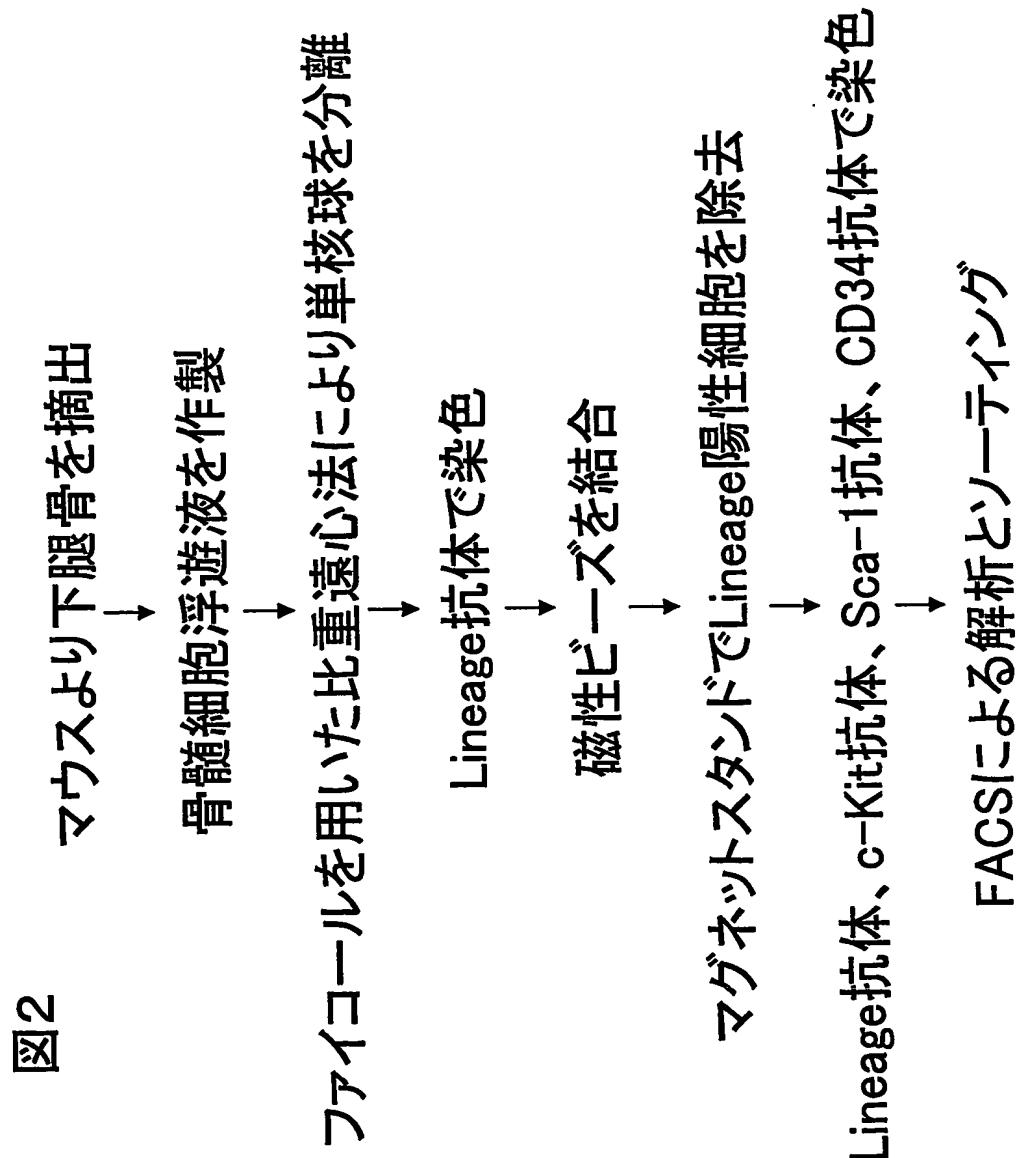
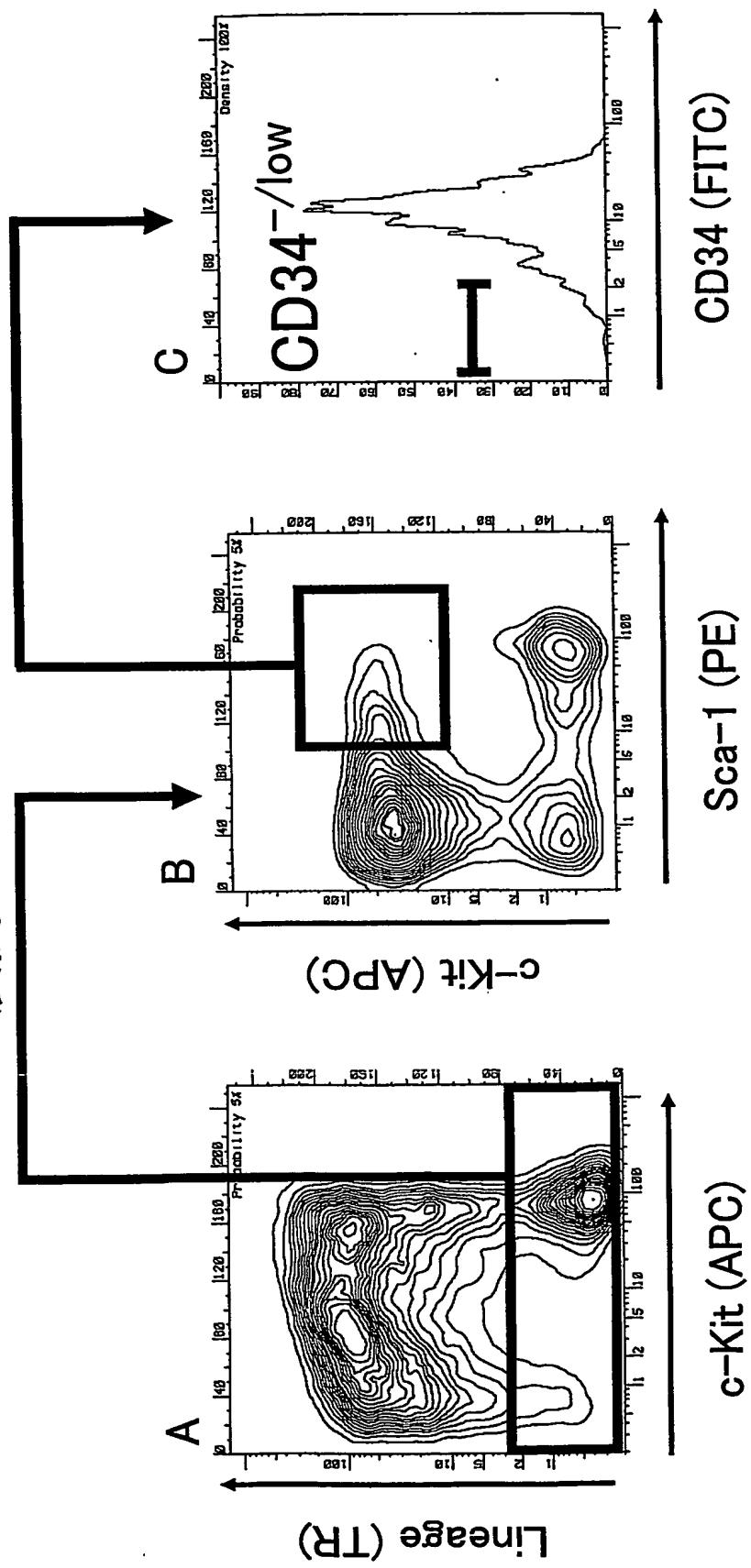


図3 $c\text{-Kit}^+ Sca-1^+$ 展開

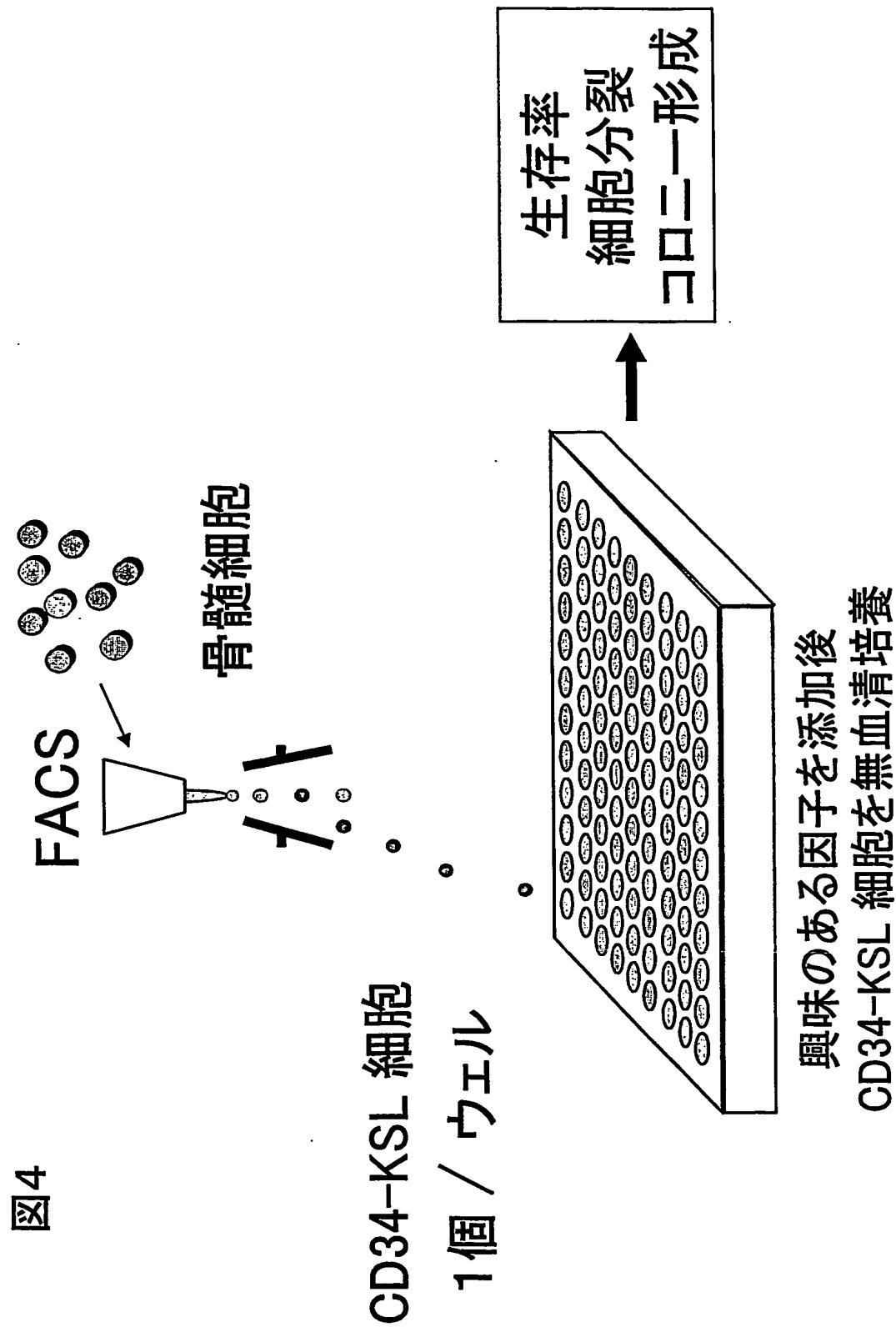
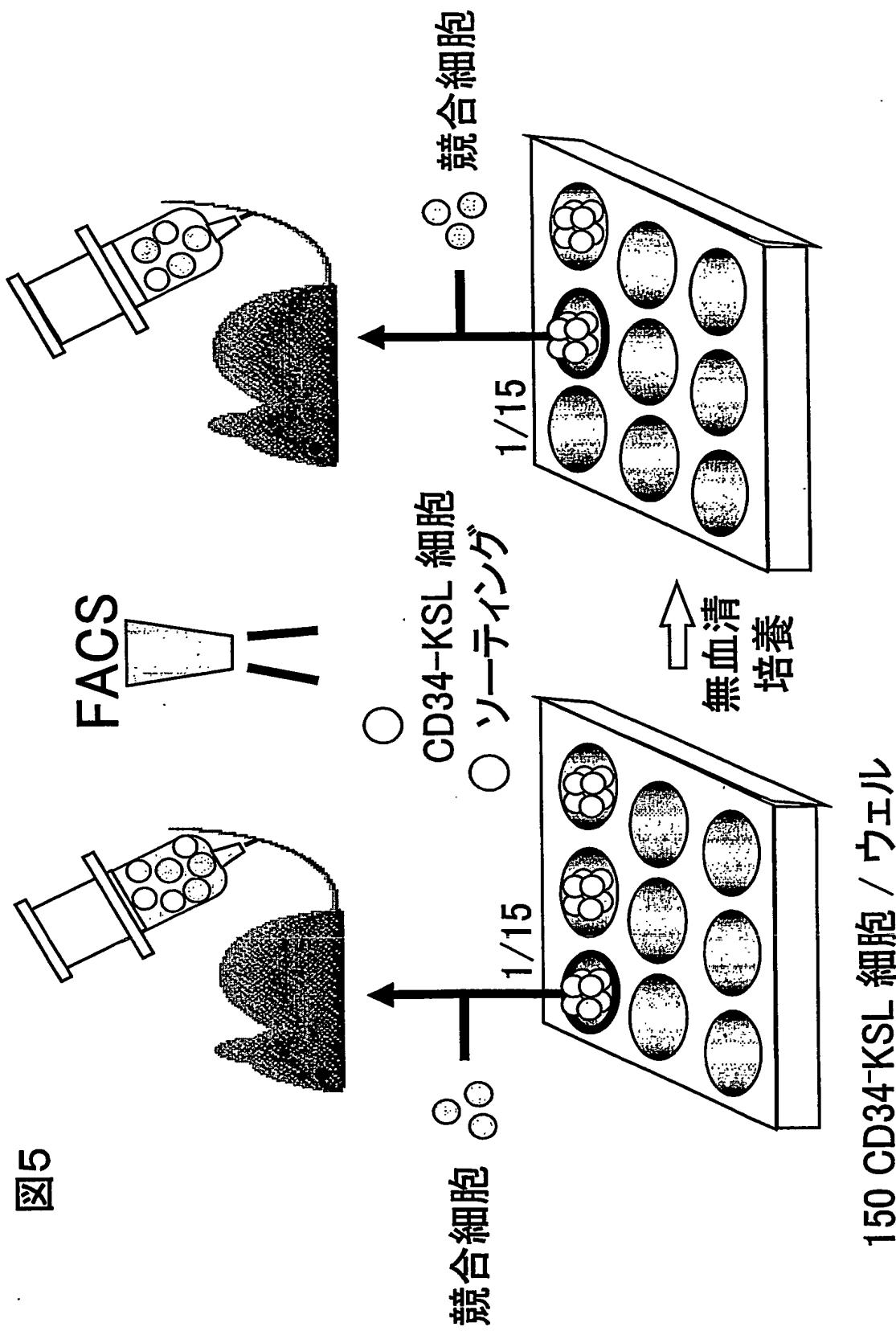


図5



SEQUENCE LISTING

<110> Trans-Science Inc., and EMA, Hideo

<120> A protein which maintains stem cells as undifferentiated

<130> TR001PCT

<140>

<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1140

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 1

atggctcgga gaagagcctt ccctgcttgc gcgcctccggc tctggagcat cctaccttgc 60
ctgctcctgc tgcgagcgga tgcagggcag ccacctgagg agagctgtt cctgtggatc 120
gacgccccatc aggcttagatg gctcatagga tttaagaag acattctgtat tgtctcggag 180
ggaaaaatgg ccccccattac acatgatttc agggaaagccc aacaaagaat gccagccatt 240
cctgtcaata tccactccat gaattttacc tggcaagctg cggggcaggc agaatacttc 300
tacgagttcc tgtctctgcg ctccctggat aaaggcatca tggcagatcc aactgtcaat 360
gtccctttgc tggaaacagt gcctcacaag gcatcagtttgc ttcaagttgg ttccctgtgt 420
ctcggcaaac aagacggggt agcagcattt gaagtgaatg tgattgtcat gaattctgaa 480
ggcaacacca tccttaggac ccctcagaat gccatcttct ttaaaacatg tcaacaagct 540
gagtgtcccg gaggggtgtcg aaatggaggc tttgttaacg aaaggcggtt ctgcgagttgt 600
ccggatgggt tctacgggcc tcactgtgag aaagccctgt gcataccccg atgtatgaac 660
ggtgtctgt gtgtcactcc tggcttctgc atctgccccctt ctggattcta cggtgtcaac 720
tgtgacaaag caaactgctc aaccacctgc tttaatggag ggacctgctt ttacccggga 780
aaatgtattt gccccttgg actcgagggaa gggcgtgtg aactcagcaa atgcccccaa 840
ccctgcccggaa atggaggtaa atgcatttgtt aaaagcaagt gtaagtcccc gaaaggttac 900

caaggagacc tgtgctctaa gcccgtctgc gagcctggct gtggtgccca cgaaacctgc 960
cacgaaccca acaagtgcga gtgtcgagag ggctggcactg gcagacactg caataagagg 1020
tatggagcca gcctcatgca tgccccgagg ccagcaggcg ccgggctgga ggcacacacg 1080
ccttcactta aaaaggctga ggtatagaagg gatccacactg aatccaatta catctggta 1140

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

Met Ala Arg Arg Arg Ala Phe Pro Ala Phe Ala Leu Arg Leu Trp Ser
1 5 10 15

Ile Leu Pro Cys Leu Leu Leu Arg Ala Asp Ala Gly Gln Pro Pro
20 25 30

Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu
35 40 45

Ile Gly Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala
50 55 60

Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Ala Gly Gln
85 90 95

Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly
100 105 110

Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro
115 120 125

His Lys Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln
130 135 140

Asp Gly Val Ala Ala Phe Glu Val Asn Val Ile Val Met Asn Ser Glu
145 150 155 160

Gly Asn Thr Ile Leu Arg Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr
165 170 175

Cys Gln Gln Ala Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys
180 185 190

Asn Glu Arg Arg Val Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His
195 200 205

Cys Glu Lys Ala Leu Cys Ile Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys
210 215 220

Val Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn
225 230 235 240

Cys Asp Lys Ala Asn Cys Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys
245 250 255

Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Glu Gln
260 265 270

Cys Glu Leu Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys
275 280 285

Ile Gly Lys Ser Lys Cys Lys Cys Pro Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu
290 295 300

Cys Ser Lys Pro Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly Thr Cys
305 310 315 320

His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly Arg His
325 330 335

Cys Asn Lys Arg Tyr Gly Ala Ser Leu Met His Ala Pro Arg Pro Ala
340 345 350

Gly Ala Gly Leu Glu Arg His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Asp
355 360 365

Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Ile Trp
370 375

<210> 3

<211> 1140

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggcccgga ggagcgcctt ccctgccgcc gcgcgtctggc tctggagcat cctcctgtgc 60
ctgtggcac tgcggcgga ggccggccg ccgcaggagg agagcctgtta cctatggatc 120
gatgctcacc aggcaagagt actcatagga tttaagaagat atatcctgtat ttttcagag 180
ggaaaaatgg cacctttac acatgattc agaaaagcgc aacagagaat gccagctatt 240
cctgtcaata tccattccat gaattttacc tggcaagctg cagggcaggc agaatacttc 300
tatgaattcc tgtcccttgcg ctccctggat aaaggcatca tggcagatcc aaccgtcaat 360
gtccctctgc tggAACAGT gcctcacaag gcatcagttt ttcaagtgg 420
cttggaaaac aggtgggtt ggcagcattt gaagtggatg tgattttat gaattctgaa 480
ggcaacaccca ttctccaaac acctcaaaat gctatcttctt taaaaacatg tctacaagct 540
gagtggccag gcgggtgccg aaatggaggc tttgttaatg aaagacgcattt ctgcgagtgt 600
cctgtatgggt tccacggacc tcactgttagt aaagccctttt gtacccacg atgtatgaat 660
ggggactttt gtgtgactcc tggttctgc atctgcccac ctggattctt tggagtgaac 720
tgtgacaaag caaactgctc aaccacctgc tttaatggag ggacctgtttt ctaccctgga 780
aaatgttattt gcccctccagg actagaggaa gaggaggatg aaatcagcaa atgcccacaa 840
ccctgtcgaa atggaggtaa atgcattgtt aaaagcaat gtaagtgttcaaaaggttac 900
cagggagacc tctgttcaaa gcctgtctgc gagcctggct gtgggtgcaca tggAACCTGC 960
catgaaccca acaaattgcca atgtcaagaa ggttggcatg gaagacactg caataaaagg 1020

tacgaagcca gcctcataca tgccctgagg ccagcaggcg cccagctcag gcagcacacg 1080
ccttcactta aaaaggccga ggagcggcgg gatccacctg aatccaatta catctggtga 1140

<210> 4
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Ala Arg Arg Ser Ala Phe Pro Ala Ala Ala Leu Trp Leu Trp Ser
1 5 10 15

Ile Leu Leu Cys Leu Leu Ala Leu Arg Ala Glu Ala Gly Pro Pro Gln
20 25 30

Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu
35 40 45

Ile Gly Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala
50 55 60

Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Ala Gly Gln
85 90 95

Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly
100 105 110

Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro
115 120 125

His Lys Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln
130 135 140

Asp Gly Val Ala Ala Phe Glu Val Asp Val Ile Val Met Asn Ser Glu
145 150 155 160

Gly Asn Thr Ile Leu Gln Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr
165 170 175

Cys Leu Gln Ala Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys
180 185 190

Asn Glu Arg Arg Ile Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe His Gly Pro His
195 200 205

Cys Glu Lys Ala Leu Cys Thr Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys
210 215 220

Val Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn
225 230 235 240

Cys Asp Lys Ala Asn Cys Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys
245 250 255

Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Glu Gln
260 265 270

Cys Glu Ile Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys
275 280 285

Ile Gly Lys Ser Lys Cys Lys Cys Ser Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu
290 295 300

Cys Ser Lys Pro Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly Thr Cys
305 310 315 320

His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Gln Glu Gly Trp His Gly Arg His
325 330 335

Cys Asn Lys Arg Tyr Glu Ala Ser Leu Ile His Ala Leu Arg Pro Ala
340 345 350

Gly Ala Gln Leu Arg Gln His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Glu
355 360 365

Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Ile Trp
370 375

<210> 5

<211> 1098

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

atggcccgga gaagagcctt ccctgcttc gtgctccggc tcggaggcat cctacccgtc 60
ctgctccgtc tacgagcggga tgcaggcag ccggcagagg agagctgtc cctgtggatc 120
gacgcccattc aggccagagt actcatagga tttaagaagat atattctgtat tgtctcggag 180
gggaaaatgg cccctttac acatgatttcc agggaaagccc aacaaagaat gcccggcatt 240
cccgtaata tccactccat gaattttacc tggcaagctt cagggcaggc agagtacttc 300
tatgagttcc tgtcgctgctc ctcgtggat aaaggcatca tggcagaccc aactgtcaat 360
gtccctcggc tggaaacagt gcctcacaag gcatcagttt ttcaagttgg ttccctgtgt 420
ctcgccaaac aggatggggt ggcagcattt gaagtgaatg tgattgtcat gaattctgaa 480
ggcaacccca tccttcggac ccctcaaaat gctatcttct ttaaaacatg tcaacaagct 540
gagtggccag gaggggtgtcg aaatggaggc ttgttaacg aaaggcgggt ctgcgagttt 600
cccgatgggt tctatggacc tcactgtgag aaagccctct gcataccctcg atgtatgaac 660
gggtgtctgt gtgtcactcc tggcttcgtc atctggccgc ctggattctca cgggtgtcaac 720
tgtgacaaag caaactgctc ggccacccgtc tttaatggag ggacctgttt ttacccagga 780
aaatgtattt gcccctccagg acttgaggga gaggcgtgtg aactcagcaa gtgcccccaa 840
ccctggccgaa acggaggtaa atgcatttgtt aaaagcaagt ctgtctgcga gcctggctgc 900
ggtgcccatg gaacctgcca cgaacccaaac aaatggccagt gtcgagaggg ctggcatggg 960
agacactgca ataaaaggta cggagccagc ctcatgcgtc ccccgaggcc agcaggcggcc 1020
gggctggagc ggcacacgccc ttcaactaaa aaggctgagg ggcggaggga tccacctgaa 1080
tccaaattaca tctggta 1098

<210> 6
<211> 365
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Arg | Arg | Arg | Ala | Phe | Pro | Ala | Phe | Val | Leu | Arg | Leu | Trp | Ser |
| 1 | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| Ile | Leu | Pro | Cys | Leu | Leu | Leu | Arg | Ala | Asp | Ala | Gly | Gln | Pro | Pro | |
| | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | | |
| Glu | Glu | Ser | Leu | Tyr | Leu | Trp | Ile | Asp | Ala | His | Gln | Ala | Arg | Val | Leu |
| | 35 | | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| Ile | Gly | Phe | Glu | Glu | Asp | Ile | Leu | Ile | Val | Ser | Glu | Gly | Lys | Met | Ala |
| | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| Pro | Phe | Thr | His | Asp | Phe | Arg | Lys | Ala | Gln | Gln | Arg | Met | Pro | Ala | Ile |
| | 65 | | | | 70 | | | | 75 | | | 80 | | | |
| Pro | Val | Asn | Ile | His | Ser | Met | Asn | Phe | Thr | Trp | Gln | Ala | Ser | Gly | Gln |
| | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | |
| Ala | Glu | Tyr | Phe | Tyr | Glu | Phe | Leu | Ser | Leu | Arg | Ser | Leu | Asp | Lys | Gly |
| | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | |
| Ile | Met | Ala | Asp | Pro | Thr | Val | Asn | Val | Pro | Arg | Leu | Gly | Thr | Val | Pro |
| | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| His | Lys | Ala | Ser | Val | Val | Gln | Val | Gly | Phe | Pro | Cys | Leu | Gly | Lys | Gln |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Asp | Gly | Val | Ala | Ala | Phe | Glu | Val | Asn | Val | Ile | Val | Met | Asn | Ser | Glu |

145

150

155

160

Gly Asn Pro Ile Leu Arg Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr
165 170 175

Cys Gln Gln Ala Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys
180 185 190

Asn Glu Arg Arg Val Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His
195 200 205

Cys Glu Lys Ala Leu Cys Ile Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys
210 215 220

Val Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn
225 230 235 240

Cys Asp Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys
245 250 255

Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Glu Gln
260 265 270

Cys Glu Leu Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys
275 280 285

Ile Gly Lys Ser Lys Ser Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly
290 295 300

Thr Cys His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly
305 310 315 320

Arg His Cys Asn Lys Arg Tyr Gly Ala Ser Leu Met His Ala Pro Arg
325 330 335

Pro Ala Gly Ala Gly Leu Glu Arg His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala

340

345

350

Glu Gly Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Ile Trp

355

360

365

〈210〉 7

<211> 1125

<212> DNA

213 <213> *Xenopus* sp.

<400> 7

atgtctctaa caggctactt tgcatcgatcg ctatgcagca tctttctgtt tattcttgca 60
catgcagatg ctgggcagca ggaggacagt ttgtacatgt ggattgtatgc tcaccaagcc 120
agagtattaa taggcttiga ggaggatatt ctgattttg cagagggaa aatggcacca 180
tttacgcatg atttttagaaa agcccagcag cgaatgcag ccataccgtt caatatccat 240
gccatgaatt ttacttggca ggcaacaggg caggcagaat acttttatga gtttttatca 300
ctgcggtcac tagataaagg aatcatggct gatccaactg tgaatatgcc attactggaa 360
acagtgcgc acaaagctac agttatacag gttgggtttc cttgccttgg aaatcaggac 420
ggtgttgtc ccttgaggt gaatgtattt gttatgaact cagaaggcaa tgtgattctt 480
cagactccac agaatgttat cttttcaag acttgccagc aagcaaaatg tacaggagga 540
tgcagaaaatg gaggtttctg caatgatagg catgtctgtt aatgtcctga tggctttat 600
ggcccacatt gtgagaaagc actctgcattt ccacgtatg tgaatggggc gctctgtgtt 660
actccctggat tggcatctg tccacctggc tattatggca tcaactgtgtt taaagtaaac 720
tgcaccacac attgtctgaa tggggaaacc tgcttctatc cagggaaatgtt cattggcccc 780
tcaggatatg aaggagaaca gtgtgaaaca agtaaatgcc agcaaccctg taggaatgg 840
ggaaaatgtt gtggaaaaaaa caaatgcaag tggccaaagg gataccaagg agatctgtgtt 900
tcaaaacctg tttgtgaacc ttctgtggc gctcatggaa cctgcattgtt acccaacaagg 960
tgtcagtgtt aagaaggctg gaatggaaaga tactgcaata agaaatacgg atccaatctc 1020
atgaatgccc taaggccaaac agggtccaga aacagacagc acacgccttc accaaaacgg 1080
actgaagaca ggcaagccctt acccgaatcc aattataatctt ggtgtt 1125

〈210〉 8

〈211〉 374

〈212〉 PRT

<213> Xenopus sp.

<400> 8

Met Ser Leu Thr Gly Tyr Phe Ala Ala Pro Leu Cys Ser Ile Phe Leu
1 5 10 15

Phe Ile Leu Ala His Ala Asp Ala Gly Gln Gln Glu Asp Ser Leu Tyr
20 25 30

Met Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu Ile Gly Phe Glu Glu
35 40 45

Asp Ile Leu Ile Val Ala Glu Gly Lys Met Ala Pro Phe Thr His Asp
50 55 60

Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile Pro Val Asn Ile His
65 70 75 80

Ala Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Thr Gly Gln Ala Glu Tyr Phe Tyr
85 90 95

Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly Ile Met Ala Asp Pro
100 105 110

Thr Val Asn Met Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro His Lys Ala Thr Val
115 120 125

Ile Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Asn Gln Asp Gly Val Ala Ala
130 135 140

Phe Glu Val Asn Val Ile Val Met Asn Ser Glu Gly Asn Val Ile Leu
145 150 155 160

Gln Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr Cys Gln Gln Ala Lys
165 170 175

Cys Thr Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys Asn Asp Arg His Val
180 185 190

Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His Cys Glu Lys Ala Leu
195 200 205

Cys Met Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys Val Thr Pro Gly Leu
210 215 220

Cys Ile Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Ile Asn Cys Asp Lys Val Asn
225 230 235 240

Cys Thr Thr His Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Phe Tyr Pro Gly Lys
245 250 255

Cys Ile Cys Pro Ser Gly Tyr Glu Gly Glu Gln Cys Glu Thr Ser Lys
260 265 270

Cys Gln Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys Ser Gly Lys Asn Lys
275 280 285

Cys Lys Cys Ser Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu Cys Ser Lys Pro Val
290 295 300

Cys Glu Pro Ser Cys Gly Ala His Gly Thr Cys Ile Glu Pro Asn Lys
305 310 315 320

Cys Gln Cys Lys Glu Gly Trp Asn Gly Arg Tyr Cys Asn Lys Tyr
325 330 335

Gly Ser Asn Leu Met Asn Ala Leu Arg Pro Thr Gly Ser Arg Asn Arg
340 345 350

Gln His Thr Pro Ser Pro Lys Arg Thr Glu Asp Arg Gln Ala Leu Pro
355 360 365

Glu Ser Asn Tyr Ile Trp

370

<210> 9

<211> 1137

<212> DNA

<213> Danio rerio

<400> 9

atggctttca ggacgcctgc tggcagctg cacctaaag cgtgcgtcct tctgctttta 60
gggggtctgc tggaagctgc ctatcaagag cgaggaacca tgtacatgtg gattgtatgcc 120
aatcaagcaa gaatattaat tggtttgaa gaggatattt taatagtctc tgaggggaaa 180
atggctccat tcacacacga cttcaggaaa gcacagcaga gaatgccagc gatacctgtc 240
aatatccatc acgtcaactt cacctggcaa gccactgatc aggcagagta ttttatgag 300
ttccagactc tgcgttctt ggataaagac attatggatc atcctactgt caatgttcct 360
cttttggat cagtgcctca caaagcatct gtggttcagg tggccttcc atgcagaggt 420
gaccaggacg gtgtggcagc atttggatgc accatcctgg tggatggatgc tggagggaaat 480
atcatcctga ggacgccaca caatgccatc ttcttcaaaa catgccagag agcaaagtgt 540
ccctggaggtt gtcgaaatgg aggctactgc aatgaaaggc aggtctgcga gtgtcaggat 600
gggtttatg gcgttcaactg tgagaaagcc ctgtgctctc caagatgcct aaatgggtgt 660
ctgtgtatga gtccaggcgt gtgtatttgt ccaccggct actttggatc cagttgtgag 720
agagcaaact gcagcaccac ctgtttgaat ggagggacgt gtttccatcc tggcaaatgc 780
atctgcgccg tgagcttga aggggtccgc tggatgtca gtaaatgtcg acagccttgc 840
aggaatggag gcaaatgcac agggagaaac aaatgcaagt gcagcaaagg atatcatgga 900
gatctgtgtcgtt ccaaagctgt ctgcgagccc agctgtggag cacacggac ctgcgtggag 960
cccaacaggtt gccagtgtcg ggaaggctgg cacggacgtc actgcaataa gagatttcgc 1020
ggaggagttt ctaacagcca gcgggtctct ccatccaaac acaagtcctcc gtctgtggcg 1080
gcggcgaagg aagcgccatga aaccagttagt ccgtctgaaa ccaactatgt ggtttaa 1137

<210> 10

<211> 378

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 10

Met Ala Phe Arg Thr Pro Ala Val Gln Leu His Leu Lys Ala Cys Val
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Gly Leu Leu Glu Ala Ala Tyr Gln Glu Arg Gly
20 25 30

Thr Met Tyr Met Trp Ile Asp Ala Asn Gln Ala Arg Ile Leu Ile Gly
35 40 45

Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala Pro Phe
50 55 60

Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile Pro Val
65 70 75 80

Asn Ile His His Val Asn Phe Thr Trp Gln Ala Thr Asp Gln Ala Glu
85 90 95

Tyr Phe Tyr Glu Phe Gln Thr Leu Arg Ser Leu Asp Lys Asp Ile Met
100 105 110

Asp Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Ser Val Pro His Lys
115 120 125

Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Arg Gly Asp Gln Asp Gly
130 135 140

Val Ala Ala Phe Glu Val Thr Ile Leu Val Met Asp Ala Gly Gly Asn
145 150 155 160

Ile Ile Leu Arg Thr Pro His Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr Cys Gln
165 170 175

Arg Ala Lys Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Tyr Cys Asn Glu
180 185 190

Arg Gln Val Cys Glu Cys Gln Asp Gly Phe Tyr Gly Val His Cys Glu
195 200 205

Lys Ala Leu Cys Ser Pro Arg Cys Leu Asn Gly Gly Leu Cys Met Ser
210 215 220

Pro Gly Val Cys Ile Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ser Ser Cys Glu
225 230 235 240

Arg Ala Asn Cys Ser Thr Thr Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Phe His
245 250 255

Pro Gly Lys Cys Ile Cys Ala Val Ser Phe Glu Gly Val Arg Cys Glu
260 265 270

Leu Ser Lys Cys Arg Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys Thr Gly
275 280 285

Arg Asn Lys Cys Lys Cys Ser Lys Gly Tyr His Gly Asp Leu Cys Ser
290 295 300

Lys Ala Val Cys Glu Pro Ser Cys Gly Ala His Gly Thr Cys Val Glu
305 310 315 320

Pro Asn Arg Cys Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly His Cys Asn
325 330 335

Lys Arg Phe Arg Gly Val Ser Asn Ser Gln Arg Val Ser Pro Ser
340 345 350

Lys His Lys Ser Pro Ser Val Ala Ala Ala Lys Glu Ala Pro Glu Thr
355 360 365

Ser Gln Pro Ser Glu Thr Asn Tyr Val Val
370 375

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 11
tgyathtgyc cnccnnggntw bwvbcd 26

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 12
rcgnctnccn ccrtcnnskrc angbcd 26

<210> 13
<211> 4817
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:pCAGGS 6xHis construct

〈400〉 13

gtcgacattt attattgact agttattaaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacgtaaa tggccgcct ggctgaccgc 120
ccaacgaccc cggcccatgg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact attacgta aactgcccac ttggcagttac 240
atcaagtgta tcataatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 300
cctggcatta tgcccagttac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
tattagtcat cgcttattacc atgggtcgag gtgagccca cgttctgctt cactctcccc 420
atctcccccc cctccccacc cccaaatttg tatttattta ttttttaattt atttttgca 480
gcgatggggg cgggggggggg gggggcgcgc gcccaggcggg gcggggcggg gcgagggcgc 540
ggcggggcgc aggccggagag gtgcggcggc agccaatcag agccggcgcgc tccgaaagtt 600
tcctttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gcccataaaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660
gggagtcgct gcgttgccct cgccccgtc cccgctccgc gcccctcgc gccgcccgc 720
ccggctctga ctgaccgcgt tactccaca ggtgagcggg cggacggcc cttctcctcc 780
gggctgtat tagcgcttgg tttaatgacg gctcgttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840
ccttaaaggg ctccgggagg gcccattgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gcccgcgtcg gcccgcgtg cccggcggct gtgagcgctg 960
cggcgcggc gcggggctt gtgcgcctcg cgtgtgcgcg aggggagcgc gcccggggc 1020
ggtccccgcg ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1080
tgggggggtg agcagggggt gtggcgcgg cggtcggct gtaacccccc cctgcacccc 1140
cctccccag ttgctgagca cggcccgct tcgggtgcgg ggctccgtgc gggcgtggc 1200
cgggggctcg ccgtgccggg cgggggtgg cggcagggtgg ggtgcgggg cgggggggg 1260
ccgcctcggg cgggggaggg ctcggggag gggcgcggcg gcccggagc gccggcggct 1320
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380
gacttccctt gtcccaaatac tggcggagcc gaaatctggg aggcgcgcgc gcacccctc 1440
tagcggcgc gggcgaagcg gtgcggcgc ggcaggaagg aaatggcgg ggagggcctt 1500
cgtgcgtcgc cgcgcgcgcg tccccctctc catctccagc ctcgggctg ccgcagggg 1560
acggctgcct tcggggggga cggggcaggg cgggggtcgg cttctggcgt gtgaccggc 1620
gctctagagc ctctgcataac catgttcatg cttctttctt tttcctacag ctccctggca 1680
acgtgcgttgt ttttgtgcgt tctcatcatt ttggcaaaga attcctcgag gctagcccat 1740
catcatcatc atcattgaaa ttcaatcctc aggtgcaggg tgcctatcag aaggtggtgg 1800
ctggtgtggc caatgcctg gtcacaaat accactgaga tcttttccc tctgcacaaa 1860
attatggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tgctaaataa aggaaattta 1920
ttttcattgc aatagtgtgt tggaaatttt tttgtctctc actcgaaagg acatatggga 1980
ggccaaatca tttaaaacat cagaatgagt atttggttt gagttggca acatatgcca 2040
tatgcgtggct gccatgaaca aagggtggcta taaagaggttc atcgtatataa gaaacagccc 2100

cctgcgtgcc attccttatt ccatagaaaa gccttgactt gaggttagat ttttttata 2160
tttggtttg ttttatTTTT ttctttaaca tccctaaaat ttcccttaca tttttacta 2220
gccagattt tccctctc ctgactactc ccagtcatag ctgtccctct tctcttatga 2280
agatccctcg acctgcagcc caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttccctgtgt 2340
aaattttat ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 2400
ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgctt 2460
ccagtcggga aacctgtcgt gccagcggat ccgcacatca attagtcagc aaccatagtc 2520
ccgccccctaa ctccgccccat cccgccccata actccgccccat tttccgccccat tttccgccccat 2580
catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcgcc ctctgagcta 2640
ttccagaagt agtgaggagg ctttttttggaa ggccttagct ttgcaaaaaa gctaacttgt 2700
ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc acaaataaag 2760
cattttttc actgcattct agttgtggtt tgcctaaact catcaatgta tcttatcatg 2820
tctggatccg ctgcattaat gaatcgccca acgcgcgggg agaggcgggt tgcttattgg 2880
gcgccttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgcctcg gtcgttcggc tgccggcagc 2940
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 3000
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 3060
ggcgccccatc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3120
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3180
cgtgcgtct cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3240
gggaagcgtg ggccttctc aatgctcagc ctgttaggtat ctcaaggctgg tgtaggtcgt 3300
tcgctccaag ctgggtgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatac 3360
cggttaactat cgtcttgagt ccaacccggta aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3420
caactggtaac aggattagca gagcgggta tgtaggtcgt gctacagagt tcttgaagtg 3480
gtggccataac tacggctaca ctagaaggac agtattttgt atctgcgttc tgctgaagcc 3540
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgtatccggc aaacaaaacca ccgctggtag 3600
cggtggtttt ttgttttgcg agcagcagat tacggcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3660
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac gttaaaggat 3720
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 3780
ttttaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat 3840
cagtggggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 3900
cgtcggttag ataactacga tacggggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 3960
accgcgagac ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag 4020
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtctt ttaatttttg 4080
ccggaaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttgc gcaacgttg ttgccattgc 4140
tacaggcatc gtgggtgtcac gctcgctt tggtaggttgc tcaattcagct ccgggtcccc 4200
acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtaa gctccctcg 4260

tccctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcatgttta tcactcatgg ttatggcagc 4320
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 4380
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgcctt gcccgccgtc 4440
aatacggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaa gtgctcatca ttggaaaacg 4500
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgtt agatccagtt cgatgttaacc 4560
cactcgatca cccaaactgtat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 4620
aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggataagg gcgacacgga aatgttgaat 4680
actcatactc ttcccttttc aatattattt aagcatttt cagggattt gtctcatgag 4740
cgatataata tttgaatgtt tttagaaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 4800
ccgaaaatgtt ccacccgtt 4817

<210> 14

<211> 1140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 14

atggctcgga gaagagccctt ccctgctttc gcgcctccggc tctggagcat ctttacccgtc 60
ctgctccctgc tgcgagcgga tgcagggcag ccacctgagg agagctgtt cctgtggatc 120
gacgcccattc aggcttaggt gctcatagga tttaagaag accttctgtat tgcgtcgag 180
ggggaaaatgg ccccccatttac acatgatttcc agggaaagccc aacaaagaat gcccggccatt 240
cctgtcaata tccactccat gaattttacc tggcaagctg cggggcaggc agaataacttc 300
tacgagttcc tgcgtctgcg ctccctggat aaaggcatca tggcagatcc aactgtcaat 360
gtccctttgc tggaaacagt gcctcacaag gcatcagttt ttcagggtgg tttccctgtt 420
ctcggcaaac aagacggggt agcagcattt gaagtgaatg tgattgtcat gaattctgaa 480
ggcaacaccca tccttaggac ccctcagaat gccatcttct tttaaaacatg tcaacaagct 540
gagtgtcccg gaggggtgtcg aaatggaggc ttttgcgtt aaaggcggtt ctgcgagtt 600
ccggatgggt tctacgggcc tcactgtgag aaagccctgt gcataccccc atgtatgaac 660
gggtggctgt gtgtcactcc tggcttctgc atctggccccc ctggattctt cgggtgtcaac 720
tgtgacaaag caaactgctc aaccacccgtt tttaatggag ggacctgtt ttacccggga 780
aaatgttattt gccccttccggc actcgaggaa gagcagtttgc aactcagcaa atgcccccaa 840

ccctgccgaa atggaggtaa atgcatttgtt aaaagcaagt gtaagtgcggaaagggttac 900
caaggagacc tggctctaa gcccgtctgc gagcctggct gtggteccca cggAACCTgc 960
cacgaaccca acaagtgcgcgtgtcgagag ggctggcactgcagacactg caataagagg 1020
tatggagcca gcctcatgca tgcccccggagg ccagcaggcg ccgggctgga gcgacacacg 1080
ccttcactta aaaaggciga ggatagaagg gatccacactg aatccaattt catctggtga 1140

<210> 15

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 15

Met Ala Arg Arg Arg Ala Phe Pro Ala Phe Ala Leu Arg Leu Trp Ser
1 5 10 15

Ile Leu Pro Cys Leu Leu Leu Arg Ala Asp Ala Gly Gln Pro Pro
20 25 30

Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu
35 40 45

Ile Gly Phe Glu Glu Asp Leu Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala
50 55 60

Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Ala Gly Gln
85 90 95

Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly

| | | |
|---|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
| Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro | | |
| 115 | 120 | 125 |
| His Lys Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Asp Gly Val Ala Ala Phe Glu Val Asn Val Ile Val Met Asn Ser Glu | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gly Asn Thr Ile Leu Arg Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Cys Gln Gln Ala Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Asn Glu Arg Arg Val Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Cys Glu Lys Ala Leu Cys Ile Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Val Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Cys Asp Lys Ala Asn Cys Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Glu Gln | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Cys Glu Leu Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Ile Gly Lys Ser Lys Cys Pro Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu | | |

290

295

300

Cys Ser Lys Pro Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly Thr Cys

305

310

315

320

His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly Arg His

325

330

335

Cys Asn Lys Arg Tyr Gly Ala Ser Leu Met His Ala Pro Arg Pro Ala

340

345

350

Gly Ala Gly Leu Glu Arg His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Asp

355

360

365

Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Ile Trp

370

375

<210> 16

<211> 1140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 16

atggctcgga gaagagcctt ccctgctttc gcgcgtccggc tctggagcat cctaccttgc 60
ctgctccctgc tgcgagcgga tgcagggcag ccacacctgagg agagcttgc cctgtggatc 120
gacgcccattc aggcttagatg gctcatagga tttgaagaag acattctgtat tgtctcgag 180
ggaaaaatgg cccccctttac acatgatttc agggaaagccc aacaaagaat gccagccatt 240
cctgtcaata tccactccat gaattttacc tggcaagctg cggggcaggc agaatacttc 300
tacgagttcc tgtctctgcg ctccattgtat aaaggcatca tggcagatcc aactgtcaat 360
gtccctttgc tggaaacagt gcctcacaag gcatcagttg ttcaagttgg tttcccggt 420
ctcggcaaac aagacgggtt agcagcattt gaagtgaatg tgattgtcat gaattctgaa 480

ggcaacacca tccttaggac ccctcagaat gccatcttct ttaaaacatg tcaacaaggct 540
gagtgtcccg gaggggtgtcg aaatggaggc ttttgtaacg aaaggcgggt ctgcgagtgt 600
ccggatgggt tctacgggcc tcactgtgag aaagccctgt gcatacccg atgtatgaac 660
ggtgtctgt gtgtcactcc tggcttctgc atctgccccct ctggattcta cggtgtcaac 720
tgtgacaaag caaactgctc aaccacctgc ttaatggag ggacctgctt ttacccggga 780
aaatgtattt gccctctgg actcgaggga gagcagtgtg aactcagcaa atgcccccaa 840
ccctgccgaaa atggaggtaa atgcattgtt aaaagcaagt gtaagtcccc gaaaggttac 900
caaggagacc tgtgctctaa gcccgtctgc gagcctggct gtggtgcaca cggAACCTgc 960
cacgaaccca acaagtgcca gtgtcgagag ggctggcacg gcagacactg caataagagg 1020
tatggagcca gcctcatgca tgcccgagg ccagcaggcg ccgggcgtgga gcgacacacg 1080
ccttcactta aaaaggctga ggatagaagg gatccacctg aatccaatta catctggtga 1140

<210> 17

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 17

Met Ala Arg Arg Arg Ala Phe Pro Ala Phe Ala Leu Arg Leu Trp Ser
1 5 10 15

Ile Leu Pro Cys Leu Leu Leu Arg Ala Asp Ala Gly Gln Pro Pro
20 25 30

Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu
35 40 45

Ile Gly Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala
50 55 60

Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile

65

70

75

80

Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Ala Gly Gln

85

90

95

Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Ile Asp Lys Gly

100

105

110

Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro

115

120

125

His Lys Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln

130

135

140

Asp Gly Val Ala Ala Phe Glu Val Asn Val Ile Val Met Asn Ser Glu

145

150

155

160

Gly Asn Thr Ile Leu Arg Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr

165

170

175

Cys Gln Gln Ala Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys

180

185

190

Asn Glu Arg Arg Val Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His

195

200

205

Cys Glu Lys Ala Leu Cys Ile Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys

210

215

220

Val Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn

225

230

235

240

Cys Asp Lys Ala Asn Cys Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys

245

250

255

Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Glu Gln

260

265

270

Cys Glu Leu Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys

275

280

285

Ile Gly Lys Ser Lys Cys Lys Cys Pro Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu

290

295

300

Cys Ser Lys Pro Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly Thr Cys

305

310

315

320

His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly Arg His

325

330

335

Cys Asn Lys Arg Tyr Gly Ala Ser Leu Met His Ala Pro Arg Pro Ala

340

345

350

Gly Ala Gly Leu Glu Arg His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Asp

355

360

365

Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Ile Trp

370

375

<210> 18

<211> 1140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 18

atggctcgga gaagagccctt ccctgctttc gcgcgtccggc tctggagcat cctacccgtc 60
ctgctcctgc tgcgagcgga tgcagggcag ccacctgagg agagcttgta cctgtggatc 120

gacgcccacg aggcttaggt gctcatagga ttgttgaagaag acattctgtat tggctcggag 180
ggaaaaatgg ccccccattac acatgattc agggaaagccc aacaaagaat gccagccatt 240
cctgtcaata tccactccat gaattttacc tggcaagctg cggggcaggc agaatacttc 300
tacgagttcc tggctctgcg ctccctggat aaaggcatca tggcagatcc aactgtcaat 360
gtccctttgc tgggaacagt gcctcacaag gcatcagttt ttcagaattgg ttcccgtgt 420
ctcggcaaac aagacggggt agcagcattt gaagtgaatg tgattgtcat gaattctgaa 480
ggcaacacca tccttaggac ccctcagaat gccatcttct ttaaaacatg tcaacaagct 540
gagtgcccgg gagggtgtcg aaatggaggc tttgttaacg aaaggcgggt ctgcgagtgt 600
ccggatgggt tctacgggcc tcactgtgag aaagccctgt gcataccccg atgtatgaac 660
gggggtctgt gtgtcactcc tggcttctgc atctgccccctt ctggattcta cgggtcaac 720
tgtgacaaag taaactgctc aaccacctgc tttatggag ggacctgtt ttacccggga 780
aaatgttattt gcccctcgg actcgaggaa gagcagttgt aactcagcaa atgcccccaa 840
ccctgcccggaa atggaggtaa atgcatttgtt aaaagcaagt gtaagtgcgg aaaaagggttac 900
caaggagacc tggctctaa gcccgtctgc gggctggct gtgggtggcca cggAACCTGC 960
cacgaaccca acaagtgcga gtgtcgagag ggctggcacg gcagacactg caataagagg 1020
tatggagcca gcctcatgca tgcccccggg ccagcaggcg ccgggctgga gcgacacacg 1080
ccttcaactta aaaaggctga ggtatagaagg gatccacactg aatccaattt catctggta 1140

<210> 19

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 19

Met Ala Arg Arg Arg Ala Phe Pro Ala Phe Ala Leu Arg Leu Trp Ser

1

5

10

15

Ile Leu Pro Cys Leu Leu Leu Arg Ala Asp Ala Gly Gln Pro Pro

20

25

30

Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 35 | 40 | 45 | |
| Ile Gly Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Ala Gly Gln | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| His Lys Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Asp Gly Val Ala Ala Phe Glu Val Asn Val Ile Val Met Asn Ser Glu | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly Asn Thr Ile Leu Arg Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Cys Gln Gln Ala Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Asn Glu Arg Arg Val Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Cys Glu Lys Ala Leu Cys Ile Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Val Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn | | | |

225

230

235

240

Cys Asp Lys Val Asn Cys Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys
245 250 255

Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Glu Gln
260 265 270

Cys Glu Leu Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys
275 280 285

Ile Gly Lys Ser Lys Cys Lys Cys Pro Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu
290 295 300

Cys Ser Lys Pro Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly Thr Cys
305 310 315 320

His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly Arg His
325 330 335

Cys Asn Lys Arg Tyr Gly Ala Ser Leu Met His Ala Pro Arg Pro Ala
340 345 350

Gly Ala Gly Leu Glu Arg His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Asp
355 360 365

Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Ile Trp
370 375

<210> 20

<211> 1140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 20

atggctcgga gaagagcctt ccctgctttc gcgcctccggc tctggagcat cctaccttgc 60
ctgctcctgc tgcgagcgga tgcagggcag ccacctgagg agagcttgta cctgtggatc 120
gacgcccattc aggcttagatgt gctcatagga tttaagaagaag acattctgtat tgtctcgagg 180
gggaaaatgg ccccccatttac acatgatttc agggaaagccc aacaaagaat gccagccatt 240
cctgtcaata tccactccat gaattttacc tggcaagctg cggggcaggc agaatacttc 300
tacgagttcc tgtctctgcg ctccctggat aaaggcatca tggcagatcc aactgtcaat 360
gtccctttgc tggaaacagt gcctcacaag gcatcagtttgc ttcaagttgg ttcccggt 420
ctcggcaaac aagacggggt agcagcattt gaagtgaatg tgattgtcat gaattctgaa 480
ggcaacacca tccttaggac ccctcagaat gccatcttct ttaaaacatg tcaacaagct 540
gagtgtcccg gaggggtgtcg aaatggaggc tttttaacg aaaggcgggt ctgcgaggt 600
ccggatgggt tctacggcc tcacigtgag aaagccctgt gcataccccg atgtatgaac 660
gggtgtctgt gtgtcactcc tggcttctgc atctggccccc ctggattcta cgggtgtcaac 720
tgtgacaaag caaactgctc aaccacctgc tttaatggag ggacctgctt ttacccggga 780
aaatgtattt gccctcctgg actcgagggaa gatcagtgtg aactcagcaa atgcccccaa 840
ccctgcccggaa atggaggtaa atgcatttgtt aaaagcaagt gtaagtgcggc gaaagggtac 900
caaggagacc tggtctctaa gcccgtctgc gagcctggct gtggtgccca cggAACCTGc 960
cacgaaccca acaagtgcacca gtgtcgagag ggctggcactg gcagacactg caataagagg 1020
tatggagcca gcctcatgca tgccccgagg ccagcaggcg ccgggctgga gcgacacacg 1080
ccttcactta aaaaggctga ggatagaagg gatccacactg aatccaattt catctggtga 1140

<210> 21

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 21

Met Ala Arg Arg Arg Ala Phe Pro Ala Phe Ala Leu Arg Leu Trp Ser

1 5 10 15

Ile Leu Pro Cys Leu Leu Leu Arg Ala Asp Ala Gly Gln Pro Pro
20 25 30

Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu
35 40 45

Ile Gly Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala
50 55 60

Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Ala Gly Gln
85 90 95

Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly
100 105 110

Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro
115 120 125

His Lys Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln
130 135 140

Asp Gly Val Ala Ala Phe Glu Val Asn Val Ile Val Met Asn Ser Glu
145 150 155 160

Gly Asn Thr Ile Leu Arg Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr
165 170 175

Cys Gln Gln Ala Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys
180 185 190

Asn Glu Arg Arg Val Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His

195

200

205

Cys Glu Lys Ala Leu Cys Ile Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys

210

215

220

Val Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn

225

230

235

240

Cys Asp Lys Ala Asn Cys Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys

245

250

255

Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Asp Gln

260

265

270

Cys Glu Leu Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys

275

280

285

Ile Gly Lys Ser Lys Cys Lys Cys Pro Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu

290

295

300

Cys Ser Lys Pro Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly Thr Cys

305

310

315

320

His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly Arg His

325

330

335

Cys Asn Lys Arg Tyr Gly Ala Ser Leu Met His Ala Pro Arg Pro Ala

340

345

350

Gly Ala Gly Leu Glu Arg His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Asp

355

360

365

Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Ile Trp

370

375

<210> 22
<211> 558
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 22
atggctcgga gaagagcctt ccctgctttc gcgcctccggc tctggagcat cctaccttgc 60
ctgctcctgc tgcgagcgga tgcagggcag ccacctgagg agagcttcta cctgtggatc 120
gacgcccattc aggcttaggt gctcatagga tttaagaag acattctgtat tgcgtcgag 180
ggaaaaatgg cccctttac acatgatttca agggaaagccc aacaaagaat gccagccatt 240
cctgtcaata tccactccat gaattttacc tggcaagctg cggggcaggc agaatacttc 300
tacgagttcc tgtctctgcg ctccctggat aaaggcatca tggcagatcc aactgtcaat 360
gtccctttgc tgggaacagt gcctcacaag gcatcagtttgc ttcaagttgg tttccctgtgt 420
ctcggcaaac aagacgggtt agcagcatttt gaagtgaatg tgattgtcat gaattctgaa 480
ggcaacaccca tccttaggac ccctcagaat gccatcttct ttaaaacaca gctagcccat 540
catcatcatc atcattga 558

<210> 23
<211> 185
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 23
Met Ala Arg Arg Arg Ala Phe Pro Ala Phe Ala Leu Arg Leu Trp Ser
1 5 10 15

Ile Leu Pro Cys Leu Leu Leu Arg Ala Asp Ala Gly Gln Pro Pro

20

25

30

Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala Arg Val Leu
35 40 45

Ile Gly Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu Gly Lys Met Ala
50 55 60

Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln Arg Met Pro Ala Ile
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr Trp Gln Ala Ala Gly Gln
85 90 95

Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly
100 105 110

Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro
115 120 125

His Lys Ala Ser Val Val Gln Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln
130 135 140

Asp Gly Val Ala Ala Phe Glu Val Asn Val Ile Val Met Asn Ser Glu
145 150 155 160

Gly Asn Thr Ile Leu Arg Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr
165 170 175

Gln Leu Ala His His His His His
180 185

<210> 24

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 24

atggctcgga gaagagcctt ccctgcttc gcgcctccggc tctggaggcat cctaccttgc 60
ctgctcctgc tgctcgactg tcaacaagct gagtgtcccg gaggggtgtcg aaatggaggc 120
ttttgtAACG aaaggcgggt ctgcgagtgt ccggatgggt tctacgggcc tcactgtgag 180
aaagccctgt gcataaccccg atgtatgaac ggtggctgtgt gtgtcactcc tggcttctgc 240
atctgccccctt ctggattcta cggtgtcaac tgtgacaaag caaactgctc aaccacctgc 300
tttaatggag ggacctgctt ttacccggga aaatgtattt gccctccctgg actcgaggga 360
gagcagtgtg aactcagcaa atgcccccaa ccctgcccga atggaggtaa atgcatttgtt 420
aaaagcaagt gtaagtgcggc gaaagggtac caaggagacc tgtgctctaa gcccgtctgc 480
gagcctggct gtggtgccca cggAACCTGC cacgaacccca acaagtgcgc gtgtcgagag 540
ggctggcactg gcagacactg caataagagg tatggagcca gcctcatgca tgccccgagg 600
ccagcaggcgc ccgggctgga ggcacacacg ccttcactta aaaaggctga ggatagaagg 660
gatccacactg aatccaatta catctggcag ctagcccatc atcatcatca tcattga 717

<210> 25

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Sequence

<400> 25

Met Ala Arg Arg Arg Ala Phe Pro Ala Phe Ala Leu Arg Leu Trp Ser
1 5 10 15

Ile Leu Pro Cys Leu Leu Leu Asp Cys Gin Gin Ala Glu Cys
20 25 30

Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys Asn Glu Arg Arg Val Cys
35 40 45

Glu Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Gly Pro His Cys Glu Lys Ala Leu Cys
50 55 60

Ile Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys Val Thr Pro Gly Phe Cys
65 70 75 80

Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn Cys Asp Lys Ala Asn Cys
85 90 95

Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Phe Tyr Pro Gly Lys Cys
100 105 110

Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Glu Gln Cys Glu Leu Ser Lys Cys
115 120 125

Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys Ile Gly Lys Ser Lys Cys
130 135 140

Lys Cys Pro Lys Gly Tyr Gln Gly Asp Leu Cys Ser Lys Pro Val Cys
145 150 155 160

Glu Pro Gly Cys Gly Ala His Gly Thr Cys His Glu Pro Asn Lys Cys
165 170 175

Gln Cys Arg Glu Gly Trp His Gly Arg His Cys Asn Lys Arg Tyr Gly
180 185 190

Ala Ser Leu Met His Ala Pro Arg Pro Ala Gly Ala Gly Leu Glu Arg
195 200 205

His Thr Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Asp Arg Arg Asp Pro Pro Glu
210 215 220

Ser Asn Tyr Ile Trp Gln Leu Ala His His His His His His
225 230 235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/09, C07K14/475, C12N5/10, A61K38/17, A61P43/00,
A61K35/14, A61K35/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/09, C07K14/475, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X A | HSIEH, JC. et al., A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities Nature(1999), Vol.398, pages 431 to 436 | 1-7 8-47, 62-74 |
| X Y | WO 00/05374 A2 (Incyte Pharm Inc.), 03 February, 2000 (03.02.00), Full text & AU 9951246 A & EP 1095142 A2 | 1-7 8-47, 62-74 |
| Y | DROUET, M. et al., Cell Cycle Activation of Peripheral Blood Stem and Progenitor Cells Expanded Ex Vivo with SCF, FLT-3 Ligand, TPO, and IL-3 Results in Accelerated Granulocyte Recovery in a Baboon model of Autologous Transplantation but G ₀ /G ₁ and S/G ₂ /M Graft Cell Content Does Not Correlate with Transplantability Stem Cells(2001), Vol.19, No.5, pages 436 to 442 | 8-47, 62-74 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 May, 2002 (29.05.02)

Date of mailing of the international search report
11 June, 2002 (11.06.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02265

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|---------------------------------------|
| Y | DROUET, M. et al., The Reduction of In Vitro Radiation-Induced Fas-Related Apoptosis in CD34 ⁺ Progenitor Cells by SCF, FLT-3 Ligand, TPO, and IL-3 in Combination Resulted in CD34 ⁺ Cell Proliferation and Differentiation Stem Cells(1999), Vol.17, No.5, pages 273 to 285 | 8-47, 62-74 |
| A | DEASY, B. M. et al., Mechanisms of Mustle Stem Cell Expansion with Cytokines Stem Cells(January 2002), Vol.20, No.1, pages 50 to 60 | 1-7, 8-47, 62-74 |
| X A | Hideo EMA et al., Zoketsu Kansaibo no Junka to Clonal na Kaiseki, Jikken Igaku (2001), Vol.19, No.15, pages 1977 to 1981 | <u>13-16</u> 1-12, 17-47, 62-74 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02265

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 48-61, 75-85

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of (continued to extra sheet)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 47 and 62 to 74 relate to a peptide having a WIF domain, a pluripotency-holding stem cell composition and a method of holding the pluripotency of stem cells with the use of a WIF peptide. The invention as set forth in claims 13 to 16 relate to stem cells which are not differentiated *in vitro* and hold the pluripotency. The "stem cells which are not differentiated *in vitro* and hold the pluripotency" involve embryonic stem cells and precultured hematopoietic stem cells. It had been well known that embryonic stem cells hold pluripotency. Also, it had been publicly known prior to the application of the present case that hematopoietic stem cells hold pluripotency (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02265

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

(Jikken Igaku, Vol. 19, No. 15, p.1977-1981).

Such being the case, there is no special technical matter in the meaning as defined in PCR Rule 13.2 common to all of the claims. Therefore, it is recognized that the inventions as set forth in claims 1 to 47 and 62 to 74 are made up of two groups of inventions, i.e., a group of the inventions as set forth in claims 13 to 16 and another group of the inventions as set forth in claims 1 to 12, 17 to 47 and 62 to 74.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/09, C07K 14/475, C12N 5/10, A61K 38/17, A61P 43/00, A61K 35/14, A61K 35/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/09, C07K 14/475, C12N 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|--------------------|
| X A | HSIEH, JC. et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities Nature (1999) Vol. 398, p. 431-436 | 1-7 8-47, 62-74 |
| X Y | WO 00/05374 A2 (INCYTE PHARM INC), 2000. 02. 03., 全文 & AU 9951246 A & EP 1095142 A2 | 1-7 8-47, 62-74 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 05. 02

国際調査報告の発送日

11.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 鑑

4 N 3038



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | 関連する請求の範囲の番号 |
|---------------------|--|---------------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| Y | DROUET, M. et al. Cell Cycle Activation of Peripheral Blood Stem and Progenitor Cells Expanded Ex Vivo with SCF, FLT-3 Ligand, TPO, and IL-3 Results in Accelerated Granulocyte Recovery in a Baboon model of Autologous Transplantation but G ₀ /G ₁ and S/G ₂ /M Graft Cell Content Does Not Correlate with Transplantability Stem Cells (2001) Vol. 19, No. 5, p. 436-442 | 8-47, 62-74 |
| Y | DROUET, M. et al. The Reduction of In Vitro Radiation-Induced Fas-Related Apoptosis in CD34 ⁺ Progenitor Cells by SCF, FLT-3 Ligand, TPO, and IL-3 in Combination Resulted in CD34 ⁺ Cell Proliferation and Differentiation Stem Cells (1999) Vol. 17, No. 5, p. 273-285 | 8-47, 62-74 |
| A | DEASY, B. M. et al. Mechanisms of Muscle Stem Cell Expansion with Cytokines Stem Cells (Jan. 2002) Vol. 20, No. 1, p. 50-60 | 1-7, 8-47, 62-74 |
| X A | 依馬秀夫 他. 造血幹細胞の純化とクローナルな解析 実験医学 (2001) 第19巻、第15号、第1977-1981 頁 | <u>13-16</u> 1-12, 17-47, 62-74 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 48-61, 75-85 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

前記請求の範囲の発明は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-47及び62-74に記載された発明は、WIFドメインを有するペプチド、該ペプチドを含有する多能性維持幹細胞組成物、及びWIFペプチドを用いた、幹細胞の多能性維持方法に関するものであり、請求の範囲13-16に記載された発明は、インビトロで分化せず多能性を有する幹細胞に関するものである。「インビトロで分化せず多能性を有する幹細胞」には、胚性幹細胞や、培養前の造血幹細胞も含まれる。胚性幹細胞が多能性を有することは周知である。また、造血幹細胞が多能性を有することも本出願前に公知である（実験医学、Vol. 19, No. 15, p. 1977-1981）。

したがって、請求の範囲の全てに共通のPCT規則13.2における特別な技術的事項はなく、請求の範囲1-47及び62-74に記載された発明は、請求の範囲13-16に記載された発明と、請求の範囲1-12、17-47及び62-74に記載された発明の2個の発明群からなるものであると認める。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。